

THELMA ALVES DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL COMO MÉTODO
DE CONFIRMAÇÃO DO PADRÃO DE
SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Candida
tropicalis* A FLUCONAZOL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2006

THELMA ALVES DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL COMO MÉTODO
DE CONFIRMAÇÃO DO PADRÃO DE
SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Candida
tropicalis* A FLUCONAZOL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes
Colombo

SÃO PAULO
2006

Silva, Thelma Alves da

Quantificação de ergosterol como método de confirmação do padrão de susceptibilidade de amostras de *Candida tropicalis* a fluconazol. / Thelma Alves da Silva. – São Paulo, 2006.
xix 84f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Ergosterol quantitation as a tool for defining the fluconazole susceptibility pattern of *C. tropicalis* strains.

1. Quantificação de ergosterol
2. Microdiluição em caldo
3. *Candida* spp
4. Resistência a fluconazol.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emília Inoue Sato

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes
Colombo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética (1584/05), contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

THELMA ALVES DA SILVA

QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL COMO MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DO PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Candida tropicalis* A FLUCONAZOL

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sonia Rozental

Prof. Dr. Maria Luiza Moretti

Dr. Guilherme Maranhão Chaves

SUPLENTE

Dr. Marcos Sergio de Toledo

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais,

Jorge Luiz Alves da Silva e Elidamares Alves da Silva

Sou-lhes muito grata pelo apoio oferecido durante toda esta jornada, fosse ele emocional ou financeiro, pois foram grandes os obstáculos vencidos e gratificantes as vitórias conquistadas.

Às minhas queridas irmãs,

Maína Alves da Silva e Flávia Alves da Silva

A quem sempre estive ligada por mútua admiração, carinho e respeito!

Ao meu amor e amigo,

Tadeu Correa Arcolini

Que desperdiçou tantos feriados ensolarados me acompanhando ao laboratório, que inventou fórmulas e preencheu tabelas quando nem eu suportava mais, que fez do meu mestrado o seu mestrado tornando-se especialista em assuntos que antes eram só meus!

Muito obrigada por estar presente nos momentos mais difíceis!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Viviane Reis de Azevedo, a minha amiga Vivi!

Menina de força, coragem e inteligência!

Dividir a bancada com você, ouvir suas histórias e acompanhar de perto o seu amadurecimento profissional, foi uma das melhores coisas que me aconteceram neste período! Muito obrigada por tudo o que você fez por mim! E olha que não foi pouco...

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação de mestrado seja um trabalho eminentemente individual e solitário, ela nunca pode ser realizada fora de um contexto pessoal e profissional afetuosos. E ainda, dificilmente é conseguida sem um conjunto de apoios, incentivos e manifestações de solidariedade. À todos que fizeram-se presentes, este espaço é dedicado à vocês.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**, pois sua notável competência profissional foi fundamental durante meu processo de formação, proporcionando-me oportunidade de aprendizagem e crescimento intelectual.

À **Thomas Chagas Cardoso Neto**, vulgo “**Faniquílson**”! Meu “ex-maior inimigo” que agora merece um agradecimento especial! Quantos microcultivos, palitos, tubos e litros de RPMI preparamos juntos? Certamente tudo seria muito mais difícil se eu não o tivesse ao meu lado!

À **Patrício Christian Godoy Martinez**, o Patito! As palavras (principalmente em português...) nunca foram o seu forte! Mas o fundo musical especial escolhido por você em todos os meus momentos importantes, fizeram-me rir, chorar, dançar... Muito obrigada por me incentivar sempre!

À **Analy Sales de Azevedo Melo**, por sua grande disposição e valiosas sugestões, que contribuíram imensamente para a qualidade deste trabalho.

À **Clédja Soares de Amorim**, responsável pela minha chegada ao LEMI. Se não fossem todos os seus conselhos e sugestões, nada disso estaria acontecendo. Muito obrigada!

À **Sarah Gonçalves e Flávia Rabelo**, integrantes da “facção mineira bem-humorada” que invadiu o LEMI! Ensinaram-me muito com seus exemplos de vida e trabalho, tornando minha jornada muito mais interessante!

À **Daniel Archimedes da Matta**, que me deixou como “herança” a árdua tarefa de desvendar o mistério da quantificação de ergosterol! Espero ter conseguido alcançar nossos objetivos e, principalmente, superado expectativas! Obrigada!

À **Edméa Helena de Oliveira e Joseli dos Santos**, que regem em conjunto as atividades e rotinas administrativas do LEMI e que por isso, são responsáveis em imprimir movimentos à nossa engrenagem.

À **Leila Paula de Almeida Monfardini e Ana Carolina de Almeida Azevedo**, que em momentos distintos me acolheram em seus laboratórios, contribuindo não só na elaboração deste trabalho como em minha formação profissional. Obrigada!

À **Thaís Guimarães, Vinícius Ponzio, Lígia Raquel Brito e Robert Rosas**, por todos os momentos compartilhados, tanto os alegres como os difíceis. Muito obrigada!

À **Miriam Amaral e André Ramos**, meus super-secretários! Sempre oferecendo incassável apoio durante a elaboração desta tese. Essa conquista também é de vocês!

Aos funcionários do Instituto Paulista de Doenças Infecciosas e Parasitárias, em especial, **Wancler Coelho, Ruy Gonçalves, Rodrigo Souza, Zelinda Nakagawa e Celso Tavares**, pessoas admiráveis e sempre prestativas! Muito obrigada pelas conversas divertidas e por todos os problemas resolvidos!

À **Maria de Jesus Lima dos Santos e Maria de Fátima de Souza Nascimento**, sempre disponíveis para uma conversa divertida e boas risadas. Vou sentir muita saudade...

Ao **Dr. Marcos Sérgio de Toledo**, por toda sua disponibilidade, contribuição e apoio técnico na revisão do texto.

À **Profª Drª Maria Magali Stelato Rocha Soares**, minha querida professora de Microbiologia durante a graduação, responsável por despertar meu interesse em Micologia. Ainda me recordo de seus ensinamentos com muito carinho! Meus eternos agradecimentos...

À todos aqueles que mesmo não mencionados acreditaram em mim e estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e realização deste estudo.

Muito Obrigada!

“Ora, visto que os homens avançam quase sempre por caminhos traçados por outros homens — ainda que sem poder trilhar a mesma via nem alcançar o mesmo mérito dos que lhes servem de modelo — o homem prudente deverá constantemente seguir o itinerário percorrido pelos grandes e imitar aqueles que mostraram-se excepcionais, a fim de que, caso o seu mérito ao deles não se iguale, possa ele ao menos recolher deste uma leve fragrância. Procederá, assim agindo, como um prudente arqueiro, que, sabedor da distância que a qualidade do seu arco permite-lhe atingir, e, reconhecendo como demasiado longínquo o alvo escolhido, fixa a pontaria num ponto muito mais alto que o estipulado, esperando, não que a sua flecha alcance uma tamanha altura, mas poder, ajudado pela mira mais alta, atingir o ponto visado.”

Nicolau Maquiavel - O Príncipe (1513)

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos especiais.....	viii
Agradecimentos.....	viii
Listas	xvi
Resumo	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia das infecções de corrente sanguínea por <i>Candida</i> spp.....	2
1.2 Importância das infecções por espécies não- <i>albicans</i> de <i>Candida</i>	9
1.3 <i>Candida tropicalis</i> : um patógeno emergente.....	13
1.4 Resistência de <i>Candida tropicalis</i> a fluconazol.....	18
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Seleção de microrganismos.....	28
3.2 Identificação de leveduras.....	28
3.2.1 Análise de micromorfologia das colônias.....	29
3.2.2 Perfil bioquímico.....	29
3.3 Testes de susceptibilidade a antifúngicos.....	30
3.4 Método de quantificação de ergosterol.....	33
3.4.1 Seleção de amostras.....	33
3.4.2 Ensaio de quantificação de ergosterol.....	33
3 Análise dos dados.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Identificação das Amostras.....	39

4.2	Perfil de Susceptibilidade das 224 cepas de <i>Candida tropicalis</i> frente ao antifúngico fluconazol pelo método de microdiluição em caldo.....	39
4.3	Perfil de Susceptibilidade das 20 cepas de <i>Candida tropicalis</i> frente ao antifúngico fluconazol pelo método de quantificação de ergosterol.....	45
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	58
7	ANEXOS	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9	Abstract	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) apresentados pelas 158 cepas de <i>Candida tropicalis</i> frente a fluconazol, pelo método de microdiluição em caldo com leituras visuais e espectrofotométricas de 24 e 48 horas.....	41
Tabela 2. Análise comparativa dos valores de concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, apresentados pelos 224 isolados de <i>Candida tropicalis</i> obtidos entre as leituras visuais e espectrofotométricas com incubação de 24 e 48 horas.....	42
Tabela 3. Detalhamento dos resultados de susceptibilidade das 20 cepas de <i>Candida tropicalis</i> que apresentaram valor de CIM $\geq 16,0\mu\text{g/mL}$ nas leituras visuais e espectrofotométricas após 48 horas de incubação.....	43
Tabela 4. Detalhamento da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos 20 isolados de <i>C. tropicalis</i> frente ao fluconazol avaliados pelas duas metodologias.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil de uma cepa considerada resistente pelo método SQM, onde a inibição de 50% de ergosterol das células fúngicas ocorre em uma concentração de aproximadamente 64,0µg/mL de fluconazol.... 47
- Figura 2.** Perfil de uma cepa considerada susceptível pelo método de SQM, onde a inibição de 50% de ergosterol ocorre em uma concentração abaixo de 16,0µg/mL de fluconazol..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Aprovado
ATCC	“American Type Culture Collection”
°C	Graus Celcius
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM ₅₀	CIM de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados
CIM ₉₀	CIM de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
e cols.	E colaboradores
ECMM	European Confederation of Medical Mycology
EIEIO	Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
F	Fator de diluição
FDA	“Food and Drug Administration”
FIMUA	National Society of Medical Mycology
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
HAART	Terapia anti-retroviral de alta potência
HIV	Human immunodeficiency virus
h	Hora (s)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
KNO ₃	Nitrato de potássio
LEMI	Laboratório Especial de Micologia
Meio C	Meio de assimilação de carbono
mm	Milimetro
mL	Mililitro
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
NaCl	Cloreto de sódio

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards	
nd o	903(Nanômetros)TJTf0 Tc3 Tw(N)TjJ7982	0

RESUMO

Introdução: A literatura registra grande variação nos índices de resistência a fluconazol observadas em amostras de *Candida tropicalis*, com índices de 0 a 35%. Esta variação faz supor que o fenômeno *in vitro* conhecido como "trailing", que é caracterizado pela inibição parcial de inóculo na presença de drogas fungistáticas, esteja sendo interpretado como resistência. Devido a essa discrepância de resultados, Arthington-Skaggs e cols.,(1999), sugeriram a técnica de quantificação de ergosterol para determinar valores de CIMs em cepas que apresentam "trailing". **Objetivos:** 1.Descrever o perfil de susceptibilidade de cepas de *C. tropicalis* isoladas de episódios de fungemia frente a fluconazol, 2.Avaliar a prevalência de cepas de *C. tropicalis* com o fenótipo "low-high MICs" observados em leitura após 24 e 48 horas de incubação e 3.Utilizar a quantificação de ergosterol como ferramenta para discriminar cepas verdadeiramente resistentes a fluconazol entre aquelas com "trailing". **Material e Métodos:** Foram incluídas 224 cepas de *C. tropicalis* provenientes de episódios de candidemia que foram encaminhados ao Laboratório Especial de Micologia, durante o período de 2000 a 2005. Após triagem de *C. albicans*, utilizando-se meio cromogênico CHROMagar- *Candida*, os isolados de *Candida* não-*albicans* foram identificados por análise do perfil bioquímico pelo método comercial ID32C e análise de microcultivo. O perfil de susceptibilidade das amostras frente à fluconazol foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com a normatização do documento do CLSI M27-A2 (2002). Os valores de CIMs foram obtidos nas leituras após 24 e 48 horas de incubação, utilizando critérios visuais e espectrofotométricos. A metodologia padrão utilizada para quantificar ergosterol de células fúngicas foi realizada de acordo com a técnica desenvolvida por Arthington-Skaggs e cols., 1999. **Resultados:** O perfil de susceptibilidade das 224 cepas de *C. tropicalis* frente à fluconazol foi analisado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento CLSI M27-A2 (2002). Com relação às leituras realizadas após 24 horas de incubação, os valores de CIM₅₀ foram de 0,5µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 1,0 µg/mL para a leitura visual. Já os valores de CIM₉₀ foram de 4,0µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 8,0 µg/mL para leitura visual. Com relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 2,0µg/mL nas duas leituras e os valores de CIM₉₀ foram de 8,0µg/mL também nos dois critérios de leitura. Houve uma concordância entre os resultados das leituras visual e espectrofotométrica de 96,87% e 98,21% após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. O fenômeno de trailing esteve presente em apenas 87 (38,83%) isolados após 24 horas de incubação, sendo que destas 9 (10,35%) foram classificados como trailing moderado/intenso. Já em relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, 118 (52,67%) isolados apresentaram crescimento de trailing e 32 (27,11%) foram classificados como trailing moderado/intenso. Todas as 20 (8,92%) cepas que apresentaram valores CIMs ≥16µg/mL em qualquer leitura após 24 horas de incubação foram submetidas à quantificação de ergosterol de suas membranas, em ensaios com exposição a diferentes concentrações de fluconazol. Destes 20 isolados, 17 (85%) foram considerados sensíveis (CIMs ≤4µg/ml) e apenas 3 (15%) isolados foram considerados resistentes (CIMs ≥64µg/ml) pela técnica de quantificação de ergosterol. **Conclusões:** 1. As leituras visuais e espectrofotométricas de ensaios com fluconazol apresentam grande semelhança de resultados; 2. O fenômeno de trailing moderado/intenso é muito freqüente com cepas de *C. tropicalis*, dificultando a interpretação dos resultados; 3. A grande maioria (85%) das 20 amostras inicialmente identificadas como resistentes nos ensaios de microdiluição apresentaram redução de ergosterol em suas membranas quando expostas a droga, mostrando tratar-se de trailing; 4. Tais dados sugerem que a ocorrência de cepas de *C. tropicalis* verdadeiramente resistentes a fluconazol seja bem menos freqüente que o sugerido na literatura.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp.

Nas últimas duas décadas, hospitais de países de todo o mundo vêm relatando o aumento significativo das infecções fúngicas invasivas, destacando-se aquelas causadas pelo gênero *Candida*. Estas infecções são de difícil diagnóstico e associadas à mortalidade atribuída da ordem de 50% (Colombo e Guimarães, 2003; Gudlaugsson et al., 2003).

Wisplinghoff et al., (2004) reuniram dados do Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological (SCOPE) envolvendo 40 hospitais terciários de várias regiões dos Estados Unidos da América. No período de março de 1995 a setembro de 2002, um total de 24.179 episódios de bacteremias e fungemias foram documentadas e o gênero *Candida* foi o 4º agente mais comum isolado em hemoculturas, respondendo por 9% das infecções da corrente sanguínea posicionando-se após os casos de bacteremia por *Staphylococcus* coagulase-negativo 31%, *Staphylococcus aureus* 20% e *Enterococcus* spp. 9%.

Mais recentemente, programa de vigilância em dois grandes centros médicos nos EUA encontrou incidência de candidemia anual de 8 casos/100.000 habitantes (Kao et al., 1999) e atualmente esta incidência encontra-se em 10 casos/100.000 habitantes (Hajjeh et al., 2004).

Na Europa, há dados recentes sugerindo que infecção por espécies de *Candida* em corrente sanguínea também seja um problema relevante.

Na Suíça, foi conduzido um estudo de vigilância entre 1991 a 2000 em 17 hospitais universitários e seus hospitais filiados, que

representavam em sua totalidade 79% de todos os hospitais terciários deste país. Observou-se *Candida* spp. como a sétima causa de infecções da corrente sangüínea correspondendo a 2,9% dos isolados de hemoculturas, sendo que sua incidência permaneceu inalterada durante os 10 anos do estudo, 5,4 casos/100.000 habitantes (Marchetti et al., 2004).

Na Inglaterra, estudo prospectivo conduzido de setembro de 1997 a dezembro de 1999 em seis hospitais documentou 163 episódios de infecções de corrente sangüínea por *Candida* spp. isoladas de 136 pacientes. A incidência de candidemia foi de 18,7 casos/100.000 habitantes, com predominância dos casos ocorridos em Unidades de Terapia Intensiva (45,4%), seguidos dos pacientes cirúrgicos (Kibbler et al., 2003).

Na Espanha, um estudo conduzido de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 documentou 345 episódios de infecções de corrente sangüínea por *Candida* isolados de 341 pacientes. A incidência de candidemia foi de 4,3 casos/100.000 habitantes, sendo que 115 (33%) pacientes se encontravam em UTI (Unidades de Terapia Intensiva) (Almirante et al., 2005).

Na Itália, um estudo epidemiológico prospectivo conduzido pelo National Society of Medical Mycology (FIMUA) realizado de setembro de 1997 a dezembro de 1999 documentou 634 episódios de fungemia isolados de 569 pacientes. A incidência de candidemia foi de 3,8 casos/ 100.000 habitantes sendo que 254 (45%) pacientes se encontravam em UTI (Tortorano et al., 2004).

As populações de risco para o desenvolvimento de candidemia têm sido documentadas em séries clínicas publicadas em várias partes do mundo.

Pacientes com internação prolongada e portadores de diferentes doenças degenerativas ou neoplásicas, assim como aqueles submetidos a transplante de órgãos, grandes cirurgias e uso de antibióticos por longos períodos são os que preferencialmente apresentam candidemias hospitalares (Colombo e Guimarães, 2003).

Em um estudo prospectivo realizado nos EUA, foram identificados 1.593 pacientes com candidemia, sendo 1.449 (91%) adultos e 144 (9%) crianças. Desses pacientes, 96% apresentaram ≥ 1 doença de base relevante, 85% tinha ≥ 2 e 66% ≥ 3 doenças de base relevantes. Analisando estes casos, foi observado que 581 deles (36%) haviam sido submetidos à cirurgia, 418 pacientes (26%) eram diabéticos, 416 (26%) eram portadores de câncer em atividade, e 325 (24%) estavam recebendo terapia imunossupressora (Pappas et al., 2003).

No Canadá, em um estudo realizado por St-Germain et al., (2001) em 51 hospitais terciários foram documentados 415 episódios de candidemia. Entre a população de risco identificada, 96 pacientes (28%) eram portadores de câncer, 24 (7%) eram diabéticos, 20 (6%) tinham sido submetidos a transplante de órgãos, 20 (6%) apresentavam insuficiência renal, 10 (3%) sofreram queimaduras, 6 (2%) sofreram trauma, 6 (2%) eram portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e 5 pacientes (2%) eram recém-nascidos prematuros.

Na Europa, em um estudo realizado pelo European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) em 30 hospitais terciários, foram documentadas 270 episódios de candidemia com 249 destes episódios (92%) em pacientes portadores de câncer. Episódios de candidemia ocorreram em 90 pacientes com tumores sólidos e 159 com doença hematológica maligna. Dos pacientes com tumores sólidos haviam 26 episódios (29%) com tumor localizado no trato genitourinário, 26 (29%) no trato gastrointestinal e 23

(25%) em cabeça e pescoço. Entre os pacientes com doença hematológica maligna haviam 110 episódios (69%) com leucemia aguda, 30 (19%) com linfoma, 14 (9%) com mieloma múltiplo e 5 episódios (3%) com leucemia crônica (Viscoli et al., 1999).

Na Itália, Pagano et al., (1999) realizaram estudo retrospectivo sobre candidemia em pacientes com doença hematológica maligna, sendo que foram documentados 76 episódios de candidemia em 73 pacientes. Entre os pacientes com doenças hematológicas malignas que evoluíram com candidemia foram identificados 29 casos (40%) de leucemia mielóide aguda, 20 casos (27%) de linfoma não-Hodgkin, 14 (19%) de leucemia linfoblástica aguda, 5 (7%) de doença de Hodgkin, 2 (3%) de mieloma múltiplo, e leucemia linfoblástica crônica, leucemia de células pilosas e anemia aplástica com 1 caso cada. Pacientes com doença hematológica maligna refratária ao tratamento quimioterápico apresentaram candidemia em 32 casos (42%). Em 28 pacientes (37%) a candidemia ocorreu durante a aplasia na fase de indução do tratamento. A presença de neutropenia antes do diagnóstico de candidemia ocorreu em 65 pacientes (86%), com contagem de neutrófilos $< 100/\text{mm}^3$ e tempo médio de 13 dias. Em 13 pacientes (17%) a infecção fúngica foi observada após o transplante de medula óssea sendo 11 alogênicos (14%) e 2 autólogos (3%).

No Brasil, Colombo et al., (1999) conduziram estudo retrospectivo em 6 hospitais terciários. Foram documentados 145 episódios de candidemia e somente 34% dos episódios (49 casos) de candidemia ocorreram em pacientes portadores de câncer. Em 12 episódios (8%) os pacientes haviam sido internados para tratamento de infecções bacterianas como pneumonia, meningite, síndrome de Fournier e endocardite. Na população de risco encontrada, 17 pacientes (12%) eram recém-nascidos prematuros, 15 (10%) possuíam diabetes melitus, 10 (7%) possuíam doença gastrointestinal, 9 (6%) apresentavam doença neurológica, 7 (5%) eram portadores de HIV, 6 (4%)

estavam desnutridos, 5 (3%) possuíam insuficiência renal crônica e 3 pacientes (2%) possuíam cirrose hepática.

Ainda no Brasil, em um estudo prospectivo realizado por Nucci et al., (1998), foram documentados 43 episódios de candidemia em pacientes portadores de câncer. Neste estudo, 21 pacientes foram diagnosticados com doença hematológica maligna e 12 com tumor sólido. Entre os pacientes com doença hematológica maligna havia 17 com leucemia (11 leucemia mielóide e 6 leucemia linfóide) e 4 pacientes com linfoma não-Hodgkin. Entre os pacientes com tumor sólido haviam 6 com carcinoma e 6 com sarcoma. Em 13 pacientes (39,4%) a candidemia ocorreu na fase inicial do tratamento quimioterápico. Pacientes com câncer em estágio terminal evoluíram para candidemia apenas em 4 casos (12,1%).

Pacientes com doenças hematológicas malignas, principalmente com leucemia aguda, apresentam maior risco para a ocorrência de candidemia entre os pacientes portadores de câncer. Contudo, embora o câncer seja a doença de base mais freqüente em diferentes estudos, é importante observar que pelo menos 2/3 das candidemias ocorrem em pacientes não portadores de doenças malignas (Colombo e Guimarães, 2003).

Pacientes internados em unidades de terapia intensiva contribuem hoje com significativa porcentagem das taxas de infecção hospitalar, embora correspondam a uma pequena parcela da população hospitalar. Pacientes internados em UTI apresentam risco de apresentar candidemia devido principalmente a procedimentos médicos invasivos a que são submetidos, ao tempo de internação prolongado, bem como a presença de bacteremias e a gravidade da doença de base (Kibbler et al., 2003).

Voss et al., (1996) realizaram estudo retrospectivo em um hospital terciário na Holanda, com 37 leitos de UTI, sobre candidemia em pacientes críticos. Foram isolados no período de janeiro de 1987 a dezembro de 1994, 40 casos de *Candida* spp. em hemocultura. O tempo de internação dos pacientes na UTI até o isolamento da *Candida* em hemocultura foi de 14 dias. A incidência média de candidemia foi 5.5 por 10.000 pacientes/dia, variando de 2.4 em 1990 para 7.4 em 1994. Em 51% dos pacientes *Candida* spp. foi o primeiro patógeno isolado em hemocultura. A presença de bacteremia antes da candidemia ocorreu em 33% dos pacientes e em 7% a bacteremia e a candidemia ocorreram simultaneamente.

Nolla-Salas et al., (1997) realizaram um estudo prospectivo multicêntrico em 28 hospitais da Espanha, com total de 418 leitos de UTI sendo documentada a incidência de candidemia em pacientes não-neutropênicos (excluídos do estudo pacientes neutropênicos, transplantados de órgãos, HIV e queimados). Entre outubro de 1991 a dezembro de 1992 foram documentados 46 episódios de candidemia (30 cirúrgicos e 16 clínicos), com incidência de 1 caso por 500 admissões na UTI. As doenças de base mais comuns encontradas foram perfuração gastrointestinal em 11 pacientes (24%), doença hepatobiliar em 8 (17,4%), tumor sólido em 8 (17,4%), pancreatite em 5 (10,9%), trauma em 4 (8,7%), doenças neurológicas que necessitaram de cirurgia em 3 (6,5%), cirurgia cardíaca em 2 (4,3%), pneumonia em 6 (13%) e outras doenças clínicas em 10 pacientes (22%). *Candida* spp. foi isolada de outros sítios antes da candidemia em 41 pacientes (89%).

A população pediátrica também está sujeita ao desenvolvimento de infecções fúngicas, sendo os neonatos a população de maior risco, e entre estes os pré - termos de muito baixo peso ao nascimento. No estudo conduzido por Stamos e Rowley (1995) nos EUA, entre janeiro de 1988 e outubro de 1992, ocorreram 70 episódios de candidemia em 65 pacientes pediátricos. Destes, 16 pacientes (25%) eram prematuros. As doenças de base documentadas nesta casuística foram doença maligna em 10 pacientes (15%),

cardiopatia em 9 pacientes (14%), síndrome do intestino curto em 9 pacientes (14%), HIV em 2 pacientes e ausência de doença de base em 8 pacientes (12%).

Zaoutis et al., (2004) nos EUA documentaram 189 episódios de infecções fúngicas de corrente sanguínea em 168 pacientes pediátricos. As doenças de base documentadas nesta casuística foram neoplasias em 24% dos pacientes, disfunções gastrintestinais em 15% e cardiopatias em 10% dos pacientes.

A avaliação de fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia foi documentada por diversos autores, utilizando estudos caso-controle. Em revisão de literatura realizada por Voss et al., (1996) os seguintes fatores foram associados ao maior risco de desenvolvimento de candidemia: idade, azotemia, cateter venoso central, quimioterapia, colonização, quebra da barreira cutâneo-mucosa, reação enxerto versus hospedeiro, hemodiálise, hiperglicemia, uso de antibióticos de amplo espectro, neutropenia, nutrição parenteral, esteróides e cirurgia.

Dentre todos os estudos disponíveis na literatura sobre fatores de risco para candidemia, destaca-se aquele conduzido por Wey et al., (1988). Neste trabalho realizado no Hospital Universitário de Iowa, entre julho de 1983 a dezembro de 1986, os fatores de risco para candidemia foram identificados a partir de estudo caso-controle. O maior fator de risco foi o uso de antibióticos administrados antes da candidemia com odds ratio (OR) de 12.50, seguida do isolamento de *Candida* de outros sítios antes da infecção hematogênica (OR 10.34), realização de hemodiálise (OR 18.13), e uso de cateter de Hickman (OR 7.23).

Diante dos fatos apresentados anteriormente, fica evidente que as infecções por *Candida* na corrente sangüínea apresentam hoje alta incidência em hospitais terciários, sendo bastante conhecidos os fatores e populações de risco para esta complicação. Infecções hematogênicas por *Candida* aumentam custo e tempo de internação, sendo sua mortalidade atribuída da ordem de 40%.

1.2 Importância das infecções por espécies não- *albicans* de *Candida*

Infecções por *Candida* não-*albicans* adquiriram grande importância na medicina contemporânea. Em 1963, eram conhecidas apenas 5 espécies de *Candida* como causadoras de doenças em seres humanos, sendo elas a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (hoje considerada uma variante da *C. albicans*), *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Atualmente são conhecidas cerca de 17 espécies de *Candida* com importância clínica. Novas espécies de fungos relacionados a diferentes síndromes clínicas vêm aumentando progressivamente, sendo consequência de diversos procedimentos médicos invasivos bem como a depressão do estado imunológico dos pacientes atendidos em hospitais terciários (Lacaz, 2002).

O aumento de infecções fúngicas por espécies não-*albicans* de *Candida* foi registrado em diversos serviços da saúde do mundo todo. Alguns autores argumentam que tal fenômeno estaria relacionado à pressão seletiva do uso de fluconazol, visto que parte destas leveduras são primariamente menos sensíveis ou resistentes a esse azólico. Outro aspecto a ser considerado é que, infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* podem ser adquiridas via exógena, durante procedimentos médicos invasivos. Tais como a utilização de cateter venoso central e alimentação parenteral (Colombo e Guimarães, 2003).

Pfaller et al., (2005) avaliaram 140.767 isolados clínicos de leveduras provenientes de 127 centros médicos distribuídos entre Ásia (23 centros), América Latina (16 centros), Europa (74 centros), América do Norte (12 centros) e Oriente Médio (2 centros). Esses isolados foram obtidos de diferentes materiais biológicos como sangue, trato genital, trato gastrointestinal e trato respiratório, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2003. Mais de 16 espécies diferentes de *Candida* foram isoladas sendo que *Candida albicans* foi a espécie mais frequente (66,2%). Uma diminuição no número de isolados de *C. albicans* foi observada no decorrer dos 7 anos de estudo, variando de 10 a 11%. Em contraste, durante este mesmo período observou-se um aumento no número de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* de 2,9% e 3,1%, respectivamente.

Este trabalho deixa claro a importância das espécies não-*albicans* em infecções superficiais e invasivas por *Candida* spp. em países do mundo todo. Em pacientes com fungemia por *Candida* spp., diferentes séries no mundo todo têm mostrado o crescente papel de espécies não-*albicans*, particularmente *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Na França, Martin et al., (2005) realizaram um estudo retrospectivo para determinar a etiologia de espécies de *Candida* isoladas de infecções hematogênicas. A espécie mais frequente foi *Candida albicans* em 49,5% dos episódios, seguida de *C. glabrata* (12,6%), *C. parapsilosis* (12,1%) e *C. tropicalis* (6,2%).

Na Espanha, Almirante et al., (2005) conduziram um estudo prospectivo sobre candidemia no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003. Foram isolados 345 episódios de fungemia com predominância de *Candida albicans* (51%), seguido por *C. parapsilosis* (23%), *C. tropicalis* (10%), *C. glabrata* (9%), *C. krusei* (4%) e outras espécies (3%).

Na Itália, Bassetti et al., (2006) conduziram um estudo retrospectivo a fim de avaliar a etiologia das candidemias em pacientes críticos no período de 1999 a 2003. A distribuição das espécies de *Candida* que causaram candidíase hematogênica foram *Candida albicans* em 40% dos pacientes, *C. parapsilosis* em 23%, *C. glabrata* em 15%, *C. tropicalis* em 9% e outras espécies em 13% dos pacientes.

Godoy et al., (2003), num estudo prospectivo multicêntrico de candidemia envolvendo 5 hospitais de 4 países da América Latina, avaliaram os agentes etiológicos relacionados a 103 casos de fungemia documentados entre os anos de 1999 e 2000. Nesta casuística de 103 amostras de espécies de *Candida* observou-se que *C. albicans* foi responsável por 42% do total de isolados encontrados. As espécies *C. tropicalis* (24%) e *C. parapsilosis* (21%) foram as principais espécies de *Candida* não-*albicans* reportadas. Os autores comentam que amostras de *C. glabrata* foram responsáveis por 8% das infecções descritas.

No Brasil, Aquino et al., (2005) realizam um estudo retrospectivo de infecções da corrente sangüínea num hospital terciário, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre 1998 a 2004. Foram documentados 131 episódios sendo que a distribuição das espécies deu-se da seguinte forma: *C. albicans* (45%), *C. parapsilosis* (24.4%), *C. tropicalis* (15.3%), *C. glabrata* (6.9%), *C. krusei* (4.6%) e 3.8% outras espécies (*C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*). *Candida albicans* foi identificada com a espécie mais prevalente (45%), contudo as espécies não-*albicans* foram predominantes (55%).

Ainda no Brasil, no período de agosto de 2002 a agosto de 2003 Antunes et al., (2004) conduziram estudo prospectivo na Santa Casa Complexo Hospitalar na cidade de Porto Alegre, para determinar a distribuição das espécies de *Candida* associadas à candidemia. A maioria dos episódios

(51,6%) ocorreu por espécies outras que *Candida albicans*, incluindo *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,3%), *C. glabrata* (3,3%), *C. krusei* (1,7%) e outras espécies (7,5%).

Colombo et al., (2003) conduziram estudo em 5 hospitais terciários e documentaram 200 episódios de infecções fúngicas por espécies de *Candida* sequencialmente obtidas. *C. albicans* foi a espécie mais frequente, responsável por 41,5% dos episódios seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com 24% e 20,5% respectivamente. Nesta casuística, tendo em vista a baixa incidência de *C. glabrata* (4,5%) e *C. krusei* (1%), o aumento de espécies não-*albicans* não parece estar relacionado à pressão seletiva do uso do fluconazol, mesmo porque este antifúngico é pouco utilizado para profilaxia ou tratamento de infecções fúngicas sistêmicas nos hospitais públicos avaliados no Brasil devido seu alto custo. Este aspecto deixa claro que outros fatores, além da pressão seletiva de azólicos, estão envolvidos no aumento verificado de espécies não-*albicans*.

Diante dos dados da literatura revisados nos parágrafos anteriores, parece evidente que a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* no Brasil e, aparentemente na América Latina, é predominantemente relacionada a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Este comportamento é diferente da realidade dos Estados Unidos e países da Europa onde há, claramente, maior ocorrência de isolados de *C. glabrata* e menor ocorrência de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Contudo, na maioria das casuísticas analisadas, *C. tropicalis* encontra-se entre as três espécies de *Candida* não *albicans* mais prevalentes. (Pfaller et al., 2001; Colombo et al., 2003b; Goldani e Mario, 2003).

1.3. *Candida tropicalis*: um patógeno emergente

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da microbiota pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa intestinal (Pfaller et al., 2004). Sua patogenicidade tem sido comprovada em modelos animais e estudos clínicos.

Sob o ponto de vista biológico, *C. tropicalis* é considerada levedura de crescimento rápido sendo que após três dias de cultivo em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar, isolados de *C. tropicalis* apresentam um aspecto macroscópico cremoso. Microscopicamente, é capaz de apresentar arranjos de blastoconídios em cadeia, ao longo das hifas e pseudo-hifas ramificadas. Suas principais características bioquímicas incluem a assimilação de açúcares (dextrose, maltose, sacarose, lactose, galactose, melibiose, celobiose, inositol, xylose, rafinose, trehalose, dulcitol, KNO₃), assim como sua fermentação (dextrose, maltose, sacarose, lactose, galactose, trehalose, celobiose) (Larone, 1995).

O primeiro passo para a infecção de tecidos por *C. tropicalis* é a adesão desse microorganismo à superfície das células epiteliais. O reconhecimento de componentes da matriz epitelial é fundamental para adesão microbiana e parece ser espécie-específica. A fibronectina (glicoproteína dimérica que faz parte da matriz extracelular, é onipresente em todos os tecidos do hospedeiro) age como receptor ao qual a *C. tropicalis* se liga, permitindo também sua adesão ao endotélio vascular (De Muri, 1996). Após a adesão à superfície do epitélio ou endotélio, proteinases auxiliam no processo de invasão tecidual (Walsh e Merz, 1986).

As espécies de *Candida* são colonizantes comuns do TGI. A *C. tropicalis* tem sido com frequência encontrada em nível do duodeno, especialmente relacionadas à diminuição da acidez gástrica. Alguns fatores podem influenciar no momento dessa colonização e, entre eles, pode ser citada a diminuição da microbiota gastrointestinal por bactérias Gram – positivas (Bernhardt e Knoke, 1997).

Comparando a patogenicidade de *C. albicans* e de *C. tropicalis* em estudos em modelos animais, há resultados contraditórios em relação à virulência destas espécies, quando o inóculo é realizado diretamente na corrente sanguínea dos roedores (Edwards et al., 1977; Has978 697.88007 Tmi 6684786 532.3

Nos EUA, em estudo retrospectivo realizado entre outubro 1998 a setembro de 2000, foram identificados 1.1143 casos de fungemia por espécies de *Candida*, sendo que destes, 141 casos (12%) foram causadas por *Candida tropicalis* a quarta espécie mais comumente isolada (Hajjeh et al., 2004).

Ainda nos EUA, um estudo retrospectivo realizado entre 1992 a 2001 em 167 diferentes centros deste país, documentaram 3.683 isolados de infecções fúngicas por espécies de *Candida*. *C. tropicalis* (9,6%) foi relatada como o quarto agente etiológico mais comum de candidemia nesta série, com 353 isolados documentados, havendo uma predominância de *C. albicans* encontrada em 2.007 episódios (54,4%) (Pfaller, 2004).

Na Itália, um estudo de vigilância de candidemias realizado em pacientes com câncer pela Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC), envolvendo 30 centros médicos universitários terciários, foram verificados 249 episódios de candidemia, de novembro de 1992 a outubro de 1994. Candidemia por *C. tropicalis* foi encontrada em 11% dos casos, antecedida por *C. albicans* (49%), com incidência similar a *C. parapsilosis* (11%), seguida por *C. glabrata* (10%) (Viscoli et al., 1999).

Ainda na Itália, um estudo retrospectivo foi realizado de janeiro de 1999 a março de 2003, a fim de se determinar a etiologia das candidemias em pacientes críticos em UTI. Dos 182 episódios documentados, *C. albicans* foi responsável por 72 episódios (40%), seguido por 41 episódios de *C. parapsilosis* (23%), 27 episódios de *C. glabrata* (15%) e 17 episódios de *C. tropicalis* (9%) (Bassetti et al., 2006).

Na Espanha, um estudo retrospectivo foi realizado com o objetivo de se conhecer a incidência de candidemia em pacientes adultos e pediátricos. Durante o período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001, foram recuperados

53 isolados de *Candida* spp. distribuídos da seguinte forma: 22 isolados de *C. parapsilosis*, 19 de *C. albicans*, 5 de *C. glabrata*, 3 de *C. krusei* e 2 episódios de *Candida tropicalis* (Durán et al., 2003).

Na Ásia, em um estudo prospectivo em um grande hospital terciário de Taiwan entre 1981 a 1993, Chen et al., (1997) encontraram 215 episódios de candidemia, *C. tropicalis* foi o segundo patógeno mais freqüente (16,7%). Neste estudo observou-se também um aumento na incidência de candidemia por *C. parapsilosis* (13,5%) e *C. glabrata* (9,3%) em seis e quatro vezes, respectivamente, sobretudo de 1989 a 1993, quando ocorreu um uso mais indiscriminado dos azólicos.

Ainda na Ásia, Bulmer et al., (1999) avaliaram 579 fungemias documentadas em 16 hospitais terciários, entre 1997 e 1998 nas Filipinas. *Candida tropicalis* foi o terceiro patógeno mais frequente (14,9%), vindo logo atrás de na distribuição das espécies de *Candida* que causaram infecção da corrente sangüínea foram a *C. albicans* em 49,6% dos episódios, *C. parapsilosis* em 17,2%, *C. tropicalis* em 14,9%, *C. glabrata* em 6,2%, *C. pelliculosa* em 4,3%, *C. krusei* em 2,4%, *C. guilliermondii* em 1,9%, *C. famata* em 0,5% e *C. lusitaniae* em 0,2 % dos episódios.

Na América Latina, o isolamento de *C. tropicalis* pode ainda maior que no Hemisfério Norte e Europa.

Na Argentina, um estudo multicêntrico retrospectivo incluindo 36 instituições foi realizado a fim de se determinar a distribuição das espécies associadas à candidemias entre abril de 1999 a abril 2000 naquele país. No total foram recuperados 265 isolados e *C. tropicalis* (15,8%) foi a 3ª espécie mais isolada, ficando atrás apenas de *C. albicans* (40,7%) e *C. parapsilosis* (28,6%) (Roderio et al., 2004).

No Chile, um estudo multicêntrico prospectivo foi realizado a fim de se conhecer a prevalência e a susceptibilidade a drogas antifúngicas de isolados recuperados de infecções fúngicas invasivas no período de um ano. *C. albicans* (40,8%) e *C. parapsilosis* (13,1%) foram os agentes mais freqüentemente recuperados de hemoculturas, seguidas por *Candida tropicalis* que foi a 3ª espécie mais isolada sendo responsável por 10% das infecções (Silva et al., 2005).

O primeiro estudo multicêntrico visando avaliar a epidemiologia de candidemias no Brasil foi realizado por Colombo et al., (1999) em seis hospitais terciários do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia. As espécies mais freqüentes foram *Candida* não-*albicans* (63%), incluindo: *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%).

Antunes et al., (2004) conduziram no período de agosto de 2002 a agosto de 2003 estudo na Santa Casa Complexo Hospitalar, Porto Alegre, Brasil, para determinar a distribuição das espécies de *Candida* associadas a candidemia naquele hospital. Dos 120 isolados recuperados, a maioria dos episódios (51,6%) ocorreu por espécies outras que *C. albicans*, incluindo *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,3%), *C. glabrata* (3,3%), *C. krusei* (1,7%) e outras espécies (7,5%).

Aquino et al., (2005) conduziram estudo retrospectivo com o objetivo de avaliar a prevalência de espécies de *Candida* em hemoculturas no período de abril de 1998 a agosto de 2004. Um total de 131 episódios de candidemia foram documentados sendo *Candida albicans* (45%) a espécie mais prevalente isolada em 58 episódios, seguida por 31 episódios de *C. parapsilosis* (24,4%) e 20 episódios de *Candida tropicalis* (15,3%).

Pasqualotto et al., (2005) desenvolveram estudo retrospectivo no período que compreendeu fevereiro de 1995 a dezembro de 2003 a fim de determinar os principais agentes etiológicos responsáveis pelos episódios de candidemia entre pacientes adultos e pediátricos na Santa Casa Complexo Hospitalar, Porto Alegre, Brasil. *Candida tropicalis* apareceu como o terceiro agente etiológico mais isolados nas duas populações estudadas, com 24 casos (21,8%) e 10 casos (13,3%) para os pacientes adultos e pediátricos, respectivamente.

Diferentemente da população adulta onde a grande maioria das séries tem mostrado alta prevalência de *C. tropicalis* em episódios de fungemia, há controvérsias sobre a real importância deste patógeno em crianças.

Stamos et al., (1995) conduziram um estudo retrospectivo de janeiro de 1988 a outubro de 1992, revisando 70 episódios de candidemia, e *C. tropicalis* ocupou o terceiro lugar em frequência (16% dos casos). Já MacDonald et al., (1998), em estudo conduzido no Hospital Infantil da Universidade do Michigan (EUA), entre janeiro de 1992 a dezembro de 1993, avaliaram 26 episódios de candidemia em uma UTI pediátrica, sendo a *C. tropicalis* responsável por um único caso.

1.4 Resistência de *Candida tropicalis* a fluconazol

A literatura registra grande variação nos índices de resistência a fluconazol observadas em amostras de *C. tropicalis*, com índices que variam de 0 a 35% (Diekema et al., 2002; Pfaller et al., 2002; Colombo et al., 2003; Ostrosky-Zeichner et al., 2003; Hajjeh et al., 2004; Goldani e Mário, 2003; Cheng et al., 2004; Pfaller, Diekema, 2002, Takakura et al., 2004).

Nos Estados Unidos, Hajjeh et al., (2004) conduziram um estudo a fim de determinar a incidência e o perfil de susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Candida* spp. originados de episódios de infecções de corrente sanguínea. *Candida tropicalis* foi responsável por 141 (12%) isolamentos, sendo que 6% (07) dos isolados apresentaram baixa susceptibilidade a fluconazol.

Ainda nos Estados Unidos, Diekema et al., (2002) conduziram um estudo em 16 hospitais no período de julho de 1998 à junho de 2001, com o objetivo de avaliar a epidemiologia das candidemias nestas instituições. Um total de 254 isolados de *Candida* spp. foram recuperados e destes 28 (11%) foram causados por *Candida tropicalis* e nenhum apresentou resistência a fluconazol.

Na Suécia, Chryssanthou (2001) conduziu um estudo com o objetivo de avaliar os perfis de susceptibilidade de 499 isolados de *Candida* spp. coletados entre 1994 a 1998. Destes isolados, apenas 11 (2,21%) foram identificados como *Candida tropicalis* e nenhum apresentou resistência a fluconazol.

No Brasil, Goldani e Mário (2003) realizaram um estudo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 1996 a 1999, a fim de determinar o perfil de susceptibilidade de 9 isolados recuperados de 7 pacientes e não encontraram resistência ao fluconazol.

Entretanto, outros autores têm encontrado taxas superiores de resistência a fluconazol em cepas de *Candida tropicalis*.

No Japão, Takakura et al., (2004) conduziram um estudo para avaliar a distribuição de espécies de *Candida* spp. originadas de episódios de candidemia. *Candida tropicalis* foi responsável por 62 (12%) episódios sendo que desses 62 isolados 22 (35,5%) apresentaram perfil resistente a fluconazol.

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, Espinel-Ingroff et al., (2005) conduziram um estudo que avaliava o perfil de susceptibilidade de amostras de *Candida* spp. Das 29 cepas de *Candida tropicalis* testadas, 06 (21%) delas apresentaram perfil resistente a fluconazol em leituras realizadas por espectrofotômetro e 05 (17%) apresentaram esse mesmo perfil em leituras visuais.

Em Taiwan, um estudo envolvendo 22 hospitais participantes do Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts (TSARY) no período de abril a junho de 1999, recuperou 632 isolados de *Candida* spp. de diferentes sítios. *Candida tropicalis* foi responsável por 163 (25,7%) isolamentos, sendo que destes 24 (14,7%) isolados apresentaram CIM para fluconazol ≥ 64 µg/ml. (Yang et al., 2004).

No Reino Unido, o perfil de susceptibilidade de 1.380 isolados de cinco espécies de *Candida* foi determinado frente à fluconazol. *Candida tropicalis* foi responsável por 55 (3,98%) isolamentos, sendo que destes 18 (32,73%) isolados apresentaram perfil resistente a fluconazol (Johnson et al., 1995).

Esta grande variação nos índices de resistência faz supor que o fenômeno *in vitro* conhecido como “trailing”, que é caracterizado pela inibição parcial de inóculo na presença de drogas fungistáticas, esteja sendo interpretado como resistência pelos investigadores (Arthington-Skaggs et al., 2000; Arthington-Skaggs et al., 2002).

Dados de St-Germain (2001) sugerem que este fenômeno parece ser espécie-específico, onde somente os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* produzem “trailing”. O autor analisou 764 isolados clínicos de leveduras e observou que 98% dos isolados apresentaram “trailing” frente aos azólicos quando as cepas testadas eram de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Já Arthington-Skaggs et al., (2002), apresentaram índices de “trailing” diferentes aos de St-Germain, onde 18,2% dos isolados de *C. albicans* apresentaram o fenômeno para o fluconazol e 16,3% para o itraconazol. Os isolados de *C. tropicalis* mostraram maior incidência de “trailing”, ocorrendo em 59,3% para fluconazol e 29,7% para itraconazol.

Alguns isolados podem apresentar crescimento de “trailing” tão intenso após 48h de incubação que muitas vezes são classificados como resistentes (Revankar et al., 1998; Marr et al., 1999; Arthington-Skaggs et al., 2000). Estes isolados podem acarretar o fenótipo conhecido como “low-high”, onde as amostras são sensíveis após 24 horas de incubação (CIM de fluconazol ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$), mas aparecem como resistentes após 48 horas de incubação (CIM de fluconazol ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) (Revankar et al., 1998; Marr et al., 1999).

Rex et al., (1998) realizaram um estudo utilizando cobaias inoculadas com cepas de *C. tropicalis* que apresentavam o fenótipo low-high e observaram que os animais apresentaram resposta à terapêutica com o fluconazol de forma similar aos isolados susceptíveis. Dados semelhantes foram encontrados por Arthington-Skaggs et al., (2000), no qual cobaias foram inoculadas com cepas de *C. albicans* que apresentaram “trailing” e eram resistentes pela metodologia do CLSI e sensíveis pelo método de quantificação do ergosterol, apresentando resposta terapêutica às doses habituais de fluconazol.

Em estudo realizado por Revankar et al., (1998), foram avaliados três pacientes com candidíase oral recorrente e múltiplos isolados destes foram submetidos a testes de susceptibilidade pela metodologia do CLSI e disco de difusão em ágar. Em todos os testes de susceptibilidade realizados pela metodologia do CLSI, os isolados apresentaram “trailing” e em um paciente, um episódio de candidíase oral foi ocasionado por cepa resistente nas leituras de 24 e 48 horas. Quando foram submetidos à técnica de difusão em ágar, estas mesmas cepas mostraram-se sensíveis. Todos os episódios responderam à terapêutica com dose habitual de fluconazol. De acordo com estes dados, o resultado obtido com a leitura de 24 horas pelo CLSI parece ser o mais apropriado para estes isolados, pois apresenta melhor correlação clínica.

Contudo, há evidências consistentes de que isolados clínicos de *C. tropicalis* podem tornar-se resistentes ao fluconazol e aos outros azólicos. Barchiesi et al., (2000) realizaram um estudo experimental para induzir resistência ao fluconazol em cepas de *C. tropicalis* susceptíveis. A análise do desenvolvimento de resistência ao fluconazol foi realizada cultivando cepas susceptíveis em meio líquido, contendo concentrações progressivas da droga, de 0,8 a 128µg/mL. As cepas desenvolveram variados níveis de resistência ao fluconazol, de acordo com as concentrações do antifúngico usadas no meio. O desenvolvimento de resistência foi rápido e pode ser observado logo após uma única subcultura em meio contendo azóis. Resistência cruzada foi observada com o itraconazol (MIC >1,0 µg /mL) e a terbinafina (MIC >512µg /mL). Cepas isoladas com crescimento em meios com concentração de 0,8µg /mL e 32µg/mL reverteram a baixos MICs (1,0µg/mL) após 12 e 11 passagens, respectivamente.

Há vários mecanismos pelos quais *Candida* spp. pode tornar-se resistente aos azólicos. Os três principais mecanismos envolvem: a) o efluxo de drogas não permitindo o acúmulo de antifúngico na célula; b) a maior expressão do gene CYP51A1 (Erg11) acarretando grande acúmulo celular da enzima 14α demetilase e c) mutações no gene CYP51A1 (Erg11) gerando

alterações na conformação espacial da enzima 14 α demetilase e prejuízo de sua afinidade aos azólicos (Sanglard et al., 2002; Casalnuovo et al., 2004). De acordo com Vandeputte et al., (2005), a expressão de bombas de efluxo não é mecanismo de resistência presente entre cepas de *Candida tropicalis* resistentes a fluconazol. Na realidade, os principais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de resistência de *C. tropicalis* a esta droga são o aumento da expressão do gene CtERG11 e, eventualmente, mutações presentes neste mesmo gene.

O fenômeno de “trailing” e as dificuldades decorrentes em sua interpretação nos laboratórios podem justificar uma grande variabilidade nos índices de resistência de *C. tropicalis* aos azólicos que tem sido reportado na literatura. É fundamental que seja melhor estudada a correlação clínica entre as diferentes leituras de *C. tropicalis* (24horas x 48horas) e a resposta terapêutica dos episódios de candidemia a estas drogas. Desta forma, métodos que tornem mais objetiva a leitura e a interpretação da atividade *in vitro* de azólicos em relação a *C. tropicalis* têm relevância fundamental para a melhor caracterização da epidemiologia de resistência a antifúngicos em relação a esta espécie.

Devido a essa discrepância de resultados *in vitro* obtidos pela metodologia do CLSI e a resposta *in vivo* obtida na terapêutica, Arthington-Skaggs et al., (1999), sugeriram a técnica de quantificação de ergosterol de células fúngicas para determinar valores de CIMs de organismos que apresentam o crescimento de “trailing”. Esta técnica tem como objetivo medir a sensibilidade de isolados de *Candida albicans* ao efeito de fluconazol na biosíntese de ergosterol, utilizando a quantificação de ergosterol no crescimento do organismo mediante exposição a várias concentrações de fluconazol (Arthington-Skaggs et al., 2000).

Uma vez que os azólicos atuam inibindo a síntese de ergosterol, é esperado que em cepas sensíveis haja redução progressiva na quantificação desta substância nas amostras expostas a concentrações deste fármaco. Caso a concentração de ergosterol não sofra redução mediante a exposição a fluconazol, a cepa é considerada resistente (Marr et al., 1999).

Acreditamos que apenas um número muito limitado de cepas de *Candida tropicalis* obtidas de episódios de candidemia têm a habilidade de expressar os mecanismos de resistência a azólicos caracterizados por Vandeputte et al., (2005).

No presente estudo iremos adotar esta técnica de quantificação de ergosterol para discriminar cepas de *Candida tropicalis* que apresentaram o crescimento de “trailing” daquelas que são verdadeiramente resistentes à fluconazol.

2. OBJETIVOS

A presente investigação tem por objetivos:

I - Descrever o perfil de susceptibilidade de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de episódios de fungemia frente a fluconazol;

II - Avaliar a prevalência de cepas de *Candida tropicalis* com o fenótipo “low-high MICs” observados em leitura após 24 e 48 horas de incubação em ensaios envolvendo fluconazol;

III - Utilizar o método de quantificação de ergosterol de células fúngicas como ferramenta para discriminar cepas verdadeiramente resistentes a fluconazol entre aquelas com “trailing”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de microrganismos

Foram incluídas neste estudo 224 cepas de *Candida tropicalis* provenientes de episódios de candidemia que foram seqüencialmente encaminhadas ao Laboratório Especial de Micologia da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo, durante o período de 2000 a 2005. As amostras foram armazenadas em um banco de microrganismos e mantidas a uma temperatura de – 70°C em meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) a 20% de glicerol, por diferentes períodos.

3.2 Identificação das leveduras

Uma vez no laboratório, as amostras foram semeadas em meio cromogênico seletivo CHROmagar *Candida*® (Microbiology Paris), para certificação da pureza do cultivo e viabilidade das colônias. Após 48h de incubação a 37°C, foram selecionadas as colônias de mesma cor, sendo em seguida semeadas em ágar Sabouraud dextrose para posterior identificação.

As colônias de coloração verde foram consideradas sugestivas de *C. albicans* e tiveram sua identificação confirmada por microcultivo para pesquisa de clamidoconídios e teste hipertônico para diferenciação de *C. dubliniensis*.

Colônias de outras cores foram consideradas como leveduras de *Candida* não-*albicans*, sendo re-isoladas em Sabouraud, para posterior identificação com base na micromorfologia e perfil bioquímico (Hazen, 1995; Baumgartner et al.,1996).

3.2.1 Análise de micromorfologia das colônias

Cada amostra foi semeada, com o auxílio de agulha de níquel-

da cúpula contendo substrato e inóculo, turvação esta necessariamente mais intensa que aquela exibida pelo controle negativo (Fricker-Hidalgo et al., 1996).

A identificação das amostras foi obtida pela análise de código numérico gerado pela presença ou ausência de crescimento em cada substrato, sendo a interpretação deste código realizada com a ajuda de Software Analítico enviado pelo fabricante (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França).

3.3 Testes de susceptibilidade a antifúngicos

Os testes de susceptibilidade a fluconazol foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme a norma de padronização publicada no documento M27-A2 pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2002). Além dos isolados clínicos problemas, um organismo controle de *C. parapsilosis*, ATCC 22019, foi incluído em cada lote de ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos. Esta verificação é possível uma vez que são conhecidas previamente as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de fluconazol esperadas para este microorganismo controle.

O meio líquido utilizado foi o RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA) com L-glutamina, 20 g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado em pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS). Este meio foi hidratado em água destilada esterilizada na concentração de 46,5 g/L e esterilizado por filtração em filtro biológico (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA).

Previamente à realização dos ensaios, o fluconazol foi diluído em dez diferentes concentrações seriadas variando de 1,25 a 64 µg/ml. As dez

diferentes concentrações do antifúngico foram posteriormente diluídas a 1:5 em RPMI-1640, sendo alíquotas de 100 µL de cada concentração dispensada, seqüencialmente, nas placas de microtitulação (Corning Inc. Costar), utilizando-se pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystem, Helsinki, Finland). Concentrações progressivas da droga foram dispensadas seqüencialmente nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 foram utilizados como controle-positivos, neles sendo dispensados apenas 100 µL do diluente do antifúngico e solução meio-inóculo. Os poços de número 12 foram utilizados como controle-negativos, contendo apenas o meio RPMI 1640. As placas foram mantidas a -20° C até sua utilização por período máximo de 6 meses.

No dia do experimento, as placas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos, antes de serem utilizadas. A partir de um cultivo de 24 a 48 horas da levedura a ser testada, realizado em ágar Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI), foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90%, determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml. Alíquotas de 100 µL da solução do inóculo padrão foram dispensadas nos poços contendo 100 µL de diferentes concentrações do antifúngico testado. Ao final, as placas foram transferidas à estufa a 35°C com leitura do teste após 48 horas de incubação.

Para determinar os valores de CIM foram realizadas leituras visuais e espectrofotométricas (Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) após 24 e 48 horas de incubação. Na leitura visual, foi definida como concentração inibitória mínima (CIM) para fluconazol a menor concentração da droga que apresente cerca de 50% de redução em sua turbidez comparativamente ao poço controle positivo.

A mesma definição foi utilizada na leitura realizada pelo espectrofotômetro, ajustado a um comprimento de onda de 490nm. O cálculo operacional realizado para a identificação de 50% de redução no valor de absorbância foi feito subtraindo-se do valor de absorbância de cada poço contendo diferentes concentrações de droga, aquela obtida pelo poço controle-negativo (branco). Esse valor ainda deverá ser dividido por dois a fim de se identificar o valor equivalente a 50% de redução de turbidez em relação ao poço controle-positivo.

Para calcular o percentual de concordância entre os resultados obtidos na leitura espectrofotométrica e visual foi considerado como concordante a diferença de valores de CIMs em até duas diluições da droga. Os critérios utilizados na definição de susceptibilidade e breakpoints para fluconazol foram aqueles sugeridos pelo CLSI, que consideram CIM sensível para este droga $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, susceptibilidade dose dependente (SDD) entre 16 e $32 \mu\text{g/ml}$ e resistente $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2002).

A intensidade do “trailing” na leitura visual foi classificada de acordo com duas categorias: leve (t), apresentando crescimento contínuo, porém reduzido nas diferentes concentrações de droga e moderado/intenso (tt/ttt), apresentando um crescimento contínuo, porém abundante nas diferentes concentrações de droga (Adaptado de Espinel-Ingroff et al., 1992).

3.4. Método de quantificação de ergosterol

3.4.1. Seleção de amostras

A partir dos resultados gerados pelas 224 amostras de *Candida tropicalis* testadas, foram selecionadas para a quantificação do ergosterol, as amostras com valores de CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ em qualquer das leituras realizadas.

3.4.2. Ensaio de quantificação de ergosterol

A metodologia padrão utilizada para quantificar ergosterol de células fúngicas foi realizada de acordo com a técnica desenvolvida por Arthington-Skaggs et al., 1999.

Tendo em vista obter a quantificação de ergosterol em amostra exposta a diferentes concentrações de fluconazol, alíquota de 100 μL de inóculo padrão (escala 3 de McFarland) foram transferidas para erlenmeyers contendo 40mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI) com quatro diferentes concentrações de fluconazol, a saber: 0 (livre de droga), 4 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$. Os erlenmeyers foram incubados “overnight” a 35°C sob agitação constante (200 rpm).

Após a incubação, as culturas com as diferentes concentrações de drogas foram transferidas para tubos de centrifugação de 50mL esterilizados, e foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em 30 mL de água destilada esterilizada e ressuspensas no agitador de tubos. Após nova centrifugação em condições similares, o sobrenadante foi novamente

desprezado e as células (“pellet”) conservadas no tubo em temperatura ambiente, até novo procedimento.

Com o objetivo de determinar-se a massa de células recuperadas no processo de centrifugação, os tubos foram pesados e o valor obtido foi subtraído do peso de um tubo similar vazio. A partir daí, as células foram homogeneizadas em 3 mL de solução de hidróxido de potássio a 25% em etanol e incubadas por 1 hora a 85°C em banho-maria. Esta fase constitui etapa fundamental, pois a saponificação é a reação responsável pela lise dos fosfolipídeos, que são as moléculas que contêm ácidos graxos. Para que isso ocorra, a amostra é colocada na presença de uma base forte como hidróxido de potássio que atua como catalisador da reação, formando sal de ácido carboxílico de cadeia longa (sabão). O etanol solubiliza a bicamada lipídica da membrana e o hidróxido de potássio, promovendo a saponificação dos fosfolipídios, mas não dos esfingolipídios e do ergosterol.

Posteriormente, 1 mL de água destilada esterilizada e 3 mL de heptano foram adicionados em cada tudo, sendo os mesmos submetidos a agitação mecânica por 3 minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por mais 20 minutos para a formação das fases aquosa e lipofílica. Por apresentarem o mesmo caráter hidrofóbico, o heptano saturado em água e o ergosterol unem-se na fase lipofílica, formando camada distinta da outra camada já formada contendo água e outros resíduos celulares.

Havendo a formação de duas camadas, alíquotas de 200µL referente a camada superficial rica em ergosterol é transferida para eppendorf de 2 mL já contendo 800µL de etanol, obtendo-se então diluição 1:5. Esta suspensão foi transferida para uma cubeta de quartzo, sendo que a leitura de absorbância é realizada no aparelho de espectrofotômetro (Microplate Reader, BioRad Laboratories Inc, Richmond) em dois diferentes comprimentos de onda 230nm e 281.5nm.

Os resultados obtidos nesta leitura foram utilizados para cálculo de ergosterol utilizando-se software não comercializado porém previamente validado, fornecido por Arthington-Skaggs et al., 1999.

Sabendo-se que tanto o ergosterol quanto o 24(28)-DHE são absorvidos a 281.5nm, a quantidade total desses esteróis produzida por um isolado pode ser mensurada da seguinte forma:

$$(1) \quad \% \text{ Esteróis} = \frac{[(A_{281.5} / 290) \times F]}{\text{Peso do pellet}}$$

Onde:

F = fator de diluição do etanol

290 = valor de *E* (em percentual por centímetro) determinado pelo ergosterol cristalino.

Contudo, sabe-se também que apenas o 24(28)-DHE é absorvido a 230nm, logo sua presença é calculada a partir dos valores de absorbância obtidos neste espectro de absorção, conforme demonstrado abaixo:

$$(2) \quad \% 24(28) \text{ DHE} = \frac{[(A_{230} / 518) \times F]}{\text{Peso do pellet}}$$

Onde:

F = fator de diluição do etanol

518 = valores de *E* (em percentual por centímetro) determinado pelo 24(28) DHE.

Conseqüentemente, a quantidade de ergosterol produzida pode ser determinada subtraindo-se do total de esteróis produzidos o valor obtido apenas pelo 24(28)DHE.

(3) $\% \text{ Ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} - \% 24(28) \text{ DHE}]$

3.5. Análise dos dados

A. Avaliou-se de forma descritiva os resultados de CIMs obtidos com isolados de *Candida tropicalis* pelo método referência. A distribuição dos valores de CIM para os antifúngicos foi analisada de duas formas:

1^o) CIM₅₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas;

2^o) CIM₉₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

B. Análise de correlação pareada entre as CIMs obtidas para fluconazol, referente aos 224 organismos testados, contrastando-se valores gerados pela leitura visual com aquele obtido com a leitura espectrofotométrica. De acordo com o critério adotado, as CIMs obtidas pela leitura espectrofotométrica foram consideradas equivalentes a leitura visual quando ambas apresentaram exatamente o mesmo valor ou diferença de até 2 diluições (valor referência \pm 2 diluições).

C. Análise da correlação dos valores entre as CIMs obtidas para fluconazol pela metodologia referência, contrastando-se valores gerados pela metodologia alternativa de quantificação de ergosterol de células fúngicas como ferramenta para confirmação de cepas verdadeiramente resistentes, diferenciando-as daquelas com “trailing”.

Os breakpoints estabelecidos pelo CLSI para fluconazol considera como CIM sensível < 8 µg/ml, susceptibilidade dose dependente (SDD) entre 16 e 32 µg/ml e CIM resistente > 64 µg/ml.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das Amostras

As 224 cepas foram semeadas no meio cromogênico CHROMagar *Candida*[®] para a verificação de sua pureza e apresentaram pigmentação azul escuro, cor esta, sugestiva de *Candida tropicalis* segundo o fabricante. Após essa triagem inicial, foi analisado o perfil bioquímico destas cepas pelo método de identificação semi-automatizado ID32C (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) e todas as amostras apresentaram perfil de *Candida tropicalis*. Foi também realizada a análise de microcultivo, e mais uma vez tais amostras apresentaram características micromorfológicas compatíveis com *Candida tropicalis*.

4.2 Perfil de Susceptibilidade das 224 cepas de *Candida tropicalis* frente ao antifúngico fluconazol pelo método de microdiluição em caldo

O perfil de susceptibilidade das 224 cepas de *Candida tropicalis* contra o antifúngico fluconazol foi analisado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). Os organismos-controle apresentaram variação de concentração inibitória mínima (CIM) entre 1,0µg/mL e 2,0µg/mL, valores compatíveis com aqueles estabelecidos pela metodologia do NCCLS, atual CLSI (CLSI, 2002).

A TABELA 1 ilustra os valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) apresentados nas leituras após 24 e 48 horas de incubação, utilizando critérios visuais e espectrofotométricos. Os valores de CIM foram determinados pela inibição de 50% de crescimento do isolado em relação ao controle positivo.

Com relação às leituras realizadas após 24 horas de incubação a variação de valores de CIM foi de 0,125µg/mL a 16,0µg/mL, tanto para a leitura visual, quanto para a leitura espectrofotométrica. O valor de CIM₅₀ (CIM de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas) foi de 0,5µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 1,0 µg/mL para a leitura visual. Em relação ao valor de CIM₉₀ (CIM de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas), este foi de 4,0µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 8,0 µg/mL para leitura visual.

Ainda com relação às leituras realizadas após 24 horas de incubação, 220 (98,21%) cepas apresentaram valor de CIM ≤8,0µg/mL, 04 (1,79%) cepas apresentaram valor de CIM entre 16,0µg/mL e 32,0µg/mL e nenhuma cepa apresentou valor de CIM ≥64,0µg/mL. Já na leitura espectrofotométrica, 217 (96,87%) cepas apresentaram valor de CIM ≤8,0µg/mL, 07 (3,13%) cepas apresentaram valor de CIM entre 16,0µg/mL e 32,0µg/mL e nenhuma cepa apresentou valor de CIM ≥64,0µg/mL.

Com relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação a variação dos valores de CIM foi de 0,125µg/mL a ≥ 64,0µg/mL para os dois critérios de leitura. O valor de CIM₅₀ foi de 2,0µg/mL nas duas leituras e o valor de CIM₉₀ foi de 8,0µg/mL também nos dois critérios de leitura. Das 224 cepas testadas, 209 (93,3%) apresentaram CIM ≤8,0µg/mL na leitura visual e 205 (91,52%) cepas apresentaram esse mesmo valor de CIM na leitura realizada pelo espectrofotômetro. Ainda com relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, 09 (4,02%) cepas apresentaram CIM entre 16,0µg/mL e 32,0µg/mL na leitura visual e 13 (5,80%) cepas apresentaram esse mesmo valor de CIM na leitura espectrofotométrica. Um total de 06 (2,68%) cepas entre as 224 testadas apresentaram valores de CIM ≥64,0µg/mL para os dois critérios de leitura.

TABELA 1. Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) apresentados pelas 224 cepas de *Candida tropicalis* frente à fluconazol, pelo método de microdiluição em caldo com leituras visuais e espectrofotométricas de 24 e 48hrs.

Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)	Leitura de 24 horas		Leitura de 48 horas	
	Visual	Espectrofotômetro	Visual	Espectrofotômetro
Variação (µg/mL)	0,125–6,0	0,125–6,0	0,125– 64,0	0,125–≥64,0
CIM₅₀^a (µg/mL)	1,0	0,5	2,0	2,0
CIM₉₀^b (µg/mL)	8,0	4,0	8,0	8,0
CIM ≤8,0µg/mL N(%)	220 (98,21)	217 (96,87)	209 (93,3)	205 (91,52)
CIM 16,0–32,0µg/mL N(%)	04 (1,79)	07 (3,13)	09 (4,02)	13 (5,80)
CIM ≥64,0µg/mL N(%)	00 (0)	00 (0)	06 (2,68)	06 (2,68)

^a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.

^b concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

O detalhamento dos resultados das leituras obtidas pelo critério visual e espectrofotométrico nos dois períodos de incubação, foi ilustrado na TABELA 2. Houve uma concordância de 96,87% entre os resultados dos dois critérios de leituras realizados com 24 horas de incubação. E em relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, a concordância entre os resultados foi de 98,21%.

TABELA 2. Análise comparativa dos valores de concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, apresentados pelos 224 isolados de *Candida tropicalis* obtidos entre as leituras visuais e espectrofotométricas com incubação de 24 e 48 horas.

Diferença em nº. de diluições entre resultados ^a								
	Resultado espectrofotométrico menor				Resultado espectrofotométrico maior			I.C. (%) ^b
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	
24 hrs	6	10	66	126	1	2	13	96,9
(%)	(2,68)	(4,46)	(29,46)	(56,25)	(0,45)	(0,89)	(5,8)	
48 hrs	2	8	53	130	2	4	25	98,2
(%)	(0,89)	(3,57)	(23,66)	(58,04)	(0,89)	(1,79)	(11,16)	

^a Disparidade expressa em número de concentrações inibitórias mínimas que separam resultados obtidos pela leitura visual comparado aos resultados obtidos pela leitura espectrofotométrica.

^b Índice de concordância entre métodos representando a porcentagem de valores de CIM obtidos pela leitura visual com igual valor ou até ± 2 diluições diferentes dos valores de CIM obtidos pela leitura espectrofotométrica.

Para que a intensidade do “trailing” das 224 cepas avaliadas pudesse ser comparada, foi estabelecido um padrão de crescimento classificado como leve (t), aquele que apresenta um crescimento contínuo, porém reduzido nas diferentes concentrações de droga e moderado/intenso (tt/ttt), aquele que também apresenta um crescimento contínuo, porém abundante nas diferentes concentrações de droga (Adaptado de Espinel-Ingroff et al., 1992).

A TABELA 3 ilustra as diferentes intensidades de “trailing” apresentado pelas 224 cepas de *Candida tropicalis* testadas. Com relação às leituras realizadas após 24 horas de incubação, apenas 87 (38,83%) isolados apresentaram crescimento de “trailing”, sendo que destas 78 (89,65%) foram classificados como “trailing” leve e 9 (10,35%) foram classificados como “trailing” moderado/intenso. Já em relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, 118 (52,67%) isolados apresentaram crescimento de

“trailing”, sendo que destas 86 (72,88%) foram classificados como “trailing” leve e 32 (27,11%) foram classificados como “trailing” moderado/intenso.

TABELA 3. Detalhamento dos resultados obtidos avaliando as diferentes intensidades de “trailing” apresentado pelas 224 cepas de *Candida tropicalis* testadas.

Intensidade de “trailing”	Leitura de 24 horas	Leitura de 48 horas
Opticamente limpo	137 (61,16%)	106 (47,32%)
t*	78 (34,82%)	86 (38,40%)
tt/ttt**	9 (4,10%)	32 (14,28%)
TOTAL	224 (100%)	224 (100%)

* “Trailing” leve: crescimento contínuo, porém reduzido nas diferentes concentrações de droga;

** “Trailing” moderado/intenso: crescimento contínuo, porém abundante nas diferentes concentrações de droga.

Das 224 cepas testadas, 20 (8,92%) apresentaram valores CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ nas leituras visuais ou espectrofotométricas após 48 horas de incubação (TABELA 4). Entre estas 20 cepas de *C. tropicalis* avaliadas, 13 (65%) apresentaram o fenótipo “low-high MIC” em leitura espectrofotométrica e 10 (50%) apresentaram este mesmo fenótipo na leitura visual.

Estas 20 cepas foram submetidas à quantificação de ergosterol de suas membranas após a exposição a diferentes concentrações do antifúngico fluconazol.

TABELA 4. Detalhamento dos resultados de susceptibilidade das 20 cepas de *Candida tropicalis* que apresentaram valor de CIM $\geq 16,0 \mu\text{g/mL}$ nas leituras visuais ou espectrofotométricas após 24 ou 48 horas de incubação.

Nº banco	Leitura com 24 horas de incubação		Leitura com 48 horas de incubação	
	Visual ($\mu\text{g/mL}$)	Espectrofotômetro ($\mu\text{g/mL}$)	Visual ($\mu\text{g/mL}$)	Espectrofotômetro ($\mu\text{g/mL}$)
1087	0,25	0,25	2,0	64,0
1405	8,0	2,0	64,0	64,0
525	4,0	4,0	64,0	64,0
1033	4,0	2,0	$\geq 64,0$	64,0
870	8,0	8,0	8,0	16,0
872	8,0	16,0	32,0	32,0
670	0,5	2,0	$\geq 64,0$	64,0
483	8,0	8,0	8,0	16,0
368	8,0	8,0	16,0	16,0
349	4,0	8,0	16,0	8,0
452A	4,0	8,0	4,0	16,0
253	16,0	16,0	16,0	16,0
89	8,0	2,0	16,0	16,0
118	8,0	16,0	16,0	16,0
122	8,0	8,0	8,0	16,0
73	8,0	8,0	16,0	16,0
111	8,0	8,0	8,0	16,0
2483A	16,0	16,0	32,0	32,0
2483B	16,0	16,0	$\geq 64,0$	$\geq 64,0$
2041A	16,0	16,0	$\geq 64,0$	32,0

A técnica de quantificação de ergosterol nas cepas que apresentaram valores de CIM $\geq 16,0 \mu\text{g/mL}$ foi considerado o critério “padrão ouro” para categorizar estes isolados como tendo perfil de susceptibilidade dose dependente (SDD) / Resistente (R) a fluconazol (ANEXO 1).

4.3 Perfil de Susceptibilidade das 20 cepas de *Candida tropicalis* frente ao antifúngico fluconazol pelo método de quantificação de ergosterol

O perfil de susceptibilidade frente à fluconazol das 20 cepas de *Candida tropicalis* que apresentaram valores de CIM $\geq 16,0 \mu\text{g/mL}$ nas leituras realizadas após 24 e 48 horas de incubação, foi analisado pelo método de quantificação de ergosterol de células fúngicas (SQM), de acordo com a metodologia padrão desenvolvida por Arthington-Skaggs et al., (1999). Os valores de CIM foram determinados pela inibição de 50% de produção de ergosterol do isolado em relação do controle positivo livre de droga.

A comparação entre os resultados obtidos com microdiluição em caldo e SQM foi ilustrada na TABELA 5. Não houve concordância de resultados nos valores de CIM apresentados entre as duas metodologias para estes isolados.

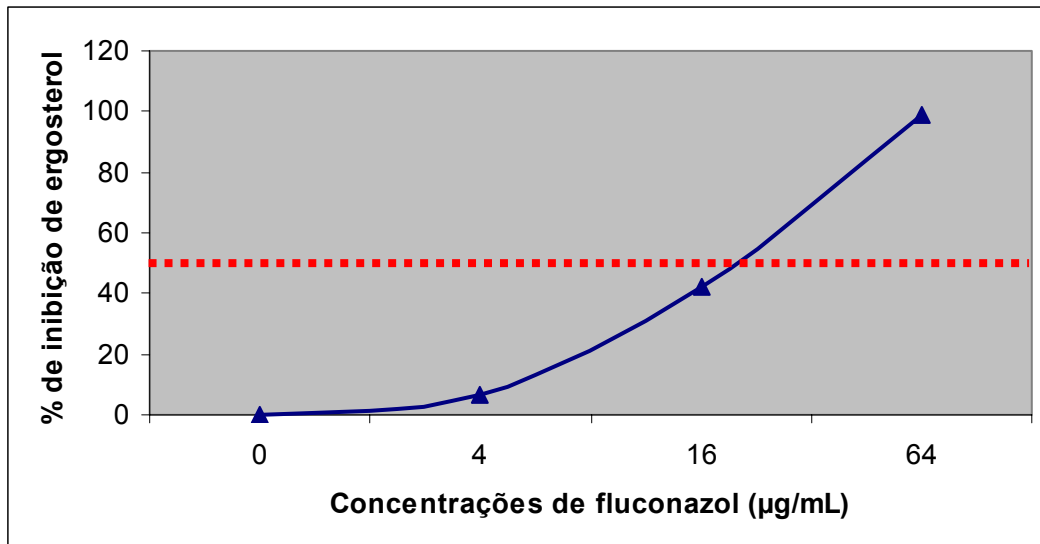
Pela metodologia de microdiluição em caldo, os 20 isolados selecionados anteriormente apresentaram valores de CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ em pelo menos um dos critérios de leitura (visual ou espectrofotométrico) realizados. Já os resultados obtidos através da técnica de quantificação de ergosterol, dos 20 isolados testados, 17 (85%) foram considerados sensíveis (CIM $< 4 \mu\text{g/mL}$) e 3 (15%) isolados foram considerados resistentes (CIM $> 64 \mu\text{g/mL}$).

TABELA 5. Detalhamento da susceptibilidade *in vitro* dos 20 isolados de *C. tropicalis* frente ao fluconazol avaliados pelas duas metodologias.

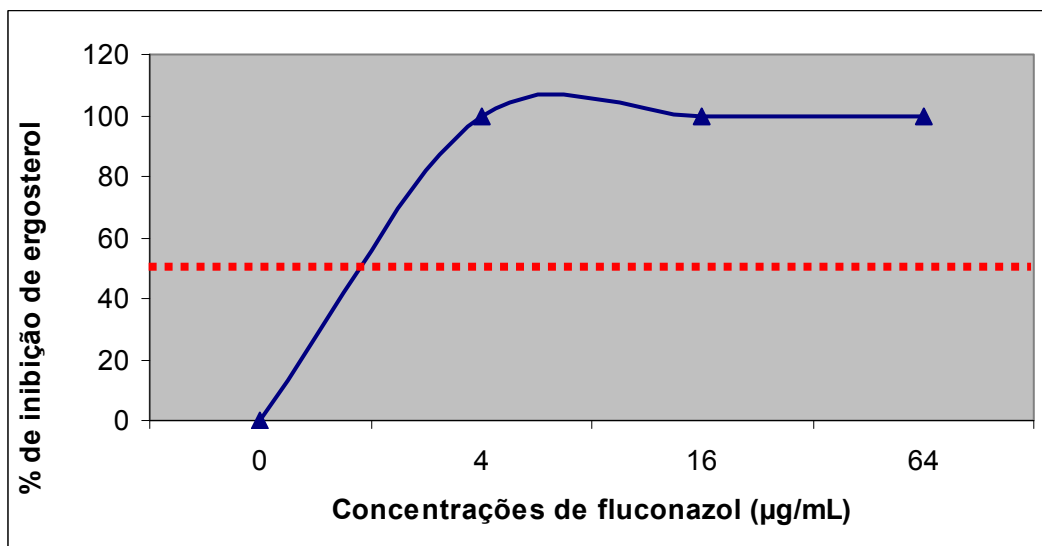
Nº do Isolado	Microdiluição em Caldo (CSLI, 2002)		Percentual de ergosterol inibido na presença de diferentes concentrações de fluconazol*				SQM (µg/mL)
	24h (µg/mL)	48h (µg/mL)	0 (µg/mL)	4 (µg/mL)	16 (µg/mL)	64 (µg/mL)	
1087	0,25	2,0	0	99,76	100	100	< 4,0
1405	8,0	64,0	0	100	100	100	< 4
525	4,0	64,0	0	99,85	100	100	< 4
1033	4,0	≥ 64,0	0	100	100	100	< 4
870	8,0	8,0	0	100	100	100	< 4
872	8,0	32,0	0	93,36	100	100	< 4
670	0,5	≥ 64,0	0	86,54	100	100	< 4
483	8,0	8,0	0	58,87	98,58	98,71	< 4
368	8,0	16,0	0	99,72	100	100	< 4
349	4,0	8,0	0	100	100	100	< 4
452 ^a	4,0	4,0	0	98,11	100	100	< 4
253	16,0	16,0	0	61,97	100	100	< 4
89	8,0	16,0	0	100	100	100	< 4
118	8,0	16,0	0	90,62	100	100	< 4
122	8,0	8,0	0	100	100	100	< 4
73	8,0	16,0	0	100	100	100	< 4
111	8,0	8,0	0	100	100	100	< 4
2483 ^a	16,0	32,0	0	6,48	42,06	99,01	> 64
2483B	16,0	≥ 64,0	0	1,27	37,61	87,30	> 64
2041 ^a	16,0	≥ 64,0	0	25,46	27,27	87,53	> 64

*Considerou-se como significativa a redução de 50% na produção de ergosterol em relação ao controle livre de droga.

A FIGURA 1 ilustra como exemplo o perfil de uma cepa considerada resistente pelo método SQM, onde a inibição de 50% de ergosterol das células fúngicas ocorre em uma concentração de aproximadamente 64,0 μ g/mL de fluconazol.



O inverso pode ser observado na FIGURA 2, onde uma cepa considerada susceptível apresenta inibição de 50% de ergosterol em uma concentração abaixo de 16,0 μ g/mL de fluconazol.



5. DISCUSSÃO

A levedura *Candida tropicalis* tem sido descrita como um dos agentes mais isolados em episódios de candidíase invasiva, principalmente em pacientes com câncer (Almirante et al., 2005; Kucukates et al., 2005; Wingard et al., 1995). Esta levedura possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal (Colombo e Guimarães, 2003).

Na América Latina, avaliando dados de SENTRY e de Godoy et al., (2003), *C. tropicalis* aparece em terceiro e segundo lugares, respectivamente, contribuindo com 12% e 24,2% do total de episódios de candidemia documentados (Pfaller et al., 2000). Colombo et al., (1999) e Costa et al., (2000) em estudos realizados em hospitais terciários brasileiros, apresentaram predomínio de candidemia por espécies não-*albicans*, 63% e 50%, respectivamente, estando *C. tropicalis* ocupando o terceiro lugar na casuística, superada apenas por *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Dados semelhantes foram encontrados por Goldani e Mario (2003), que avaliaram 101 episódios de candidemia e concluíram que *C. tropicalis* (24%) foi o segundo patógeno mais freqüentemente isolado, responsável por 27 casos.

Nos EUA, *C. glabrata* é a espécie não *albicans* mais freqüente. Este achado talvez tenha relação com o maior uso do fluconazol, em regimes de profilaxia e/ou terapia empírica naquele país. Dados do SCOPE e do EIEIO ilustram este fato, no qual *C. tropicalis* ocupa o terceiro lugar na casuística, antecedida por *C. albicans* e *C. glabrata* (Pfaller et al., 1998a; Diekema et al., 2002). No entanto, programa SENTRY, em que foram avaliados apenas episódios de candidemia nos EUA, *C. tropicalis* é o quarto patógeno mais freqüente (Pfaller et al., 1998b).

Na Europa, o comportamento epidemiológico é semelhante ao encontrado nos EUA, com menor frequência de ocorrência desta espécie quando comparada aos hospitais da América Latina. Dados de SENTRY europeu e do ECMM ilustram *C. tropicalis* como o quarto patógeno mais freqüente em episódios de candidemia (6% dos casos), também antecedida por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Pfaller et al., 1999; Tortorano et al., 2002).

No continente asiático, a incidência de *C. tropicalis* é semelhante ao encontrado na América Latina. Chen et al., (1997), avaliaram 1.337 episódios de fungemias nosocomiais, onde *C. tropicalis* foi o segundo agente mais isolado. Na Índia, Mathews et al., (2001) observaram que *C. tropicalis* é o agente mais comum de candidemia, sendo responsável por 66% dos episódios desta infecção nesse país.

Assim sendo, é de grande importância o interesse na condução de estudos microbiológicos que ofereçam informações de utilidade para a otimização da abordagem terapêutica dessas infecções.

A emergência de leveduras de *Candida* não-*albicans* como causa de infecções superficiais e invasivas e a menor susceptibilidade aos azólicos apresentada por estas, aumentou o interesse da comunidade científica no aperfeiçoamento de testes de susceptibilidade para auxiliar na escolha mais adequada na terapêutica antifúngica (Rex et al., 2001; Pfaller et al., 2002; Bedout et al., 2003).

No final da década de 80, como parte da estratégia para obter um método de alta reprodutibilidade, o CLSI realizou estudos multicêntricos para definir as condições ideais de realização dos ensaios. Neste sentido, as variáveis mais importantes na definição do resultado final do teste e que foram objeto de

padronização, incluíram a definição de método e preparação de inóculo, composição e pH do meio a ser utilizado, temperatura e tempo de incubação e determinação dos critérios de leitura do teste (Pfaller et al., 1988; Pfaller et al., 1990; Espinel-Ingroff et al., 1992; Fromtling et al., 1993; Pfaller, Rinaldi, 1993; Rex et al., 1993; Rex et al., 2001; CLSI, 2002).

Estes estudos foram fundamentais para a padronização do teste de susceptibilidade a antifúngicos pelo CLSI que ocorreu após 15 anos de trabalhos colaborativos possibilitando a publicação de normas e técnicas envolvendo os documentos M27-P (proposta - 1992), M27-T (tentativa - 1995), M27-A (aprovado - 1997) e, mais recentemente a versão M27A-2 (2002) (CLSI, 1992; CLSI, 1995; CLSI, 1997; Rex et al., 2001; CLSI, 2002).

Tais documentos fundamentaram a metodologia de diluição em caldo (macrodiluição ou microdiluição em caldo como técnica equivalente) como padrão ouro para testes de susceptibilidade a antifúngicos. Desta forma, o CLSI estabeleceu a utilização do meio de cultura RPMI -1640 com L-glutamina, sem bicarbonato e tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) com pH 7,0; o tamanho do inóculo de $0,5 \text{ à } 2,5 \times 10^3$ UFC/mL utilizando espectrofotometria, a temperatura de incubação de 35°C com períodos variando de 48h para isolados de *Candida* spp. e 72h para *Cryptococcus neoformans*. O critério de leitura dos ensaios com azólicos e 5-FC foi definido como a menor concentração capaz de gerar inibição significativa (50% para microdiluição e 80% para macrodiluição). Para anfotericina-B, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visível (Pfaller et al., 1988; Pfaller et al., 1990; Espinel-Ingroff et al., 1992; Fromtling et al., 1993; Pfaller, Rinaldi, 1993; Rex et al., 1993; Rex et al., 2001; CLSI, 2002).

O maior desafio e principal objetivo dos testes de susceptibilidade a antifúngicos é apresentar boa correlação clínico-laboratorial. Esta determinação

com a metodologia do CLSI não é perfeita, particularmente em pacientes portadores de micoses invasivas. (Rex, Pfaller, 2002; Loeffler, Stevens, 2003; Hospenthal et al., 2004).

A análise dos resultados obtidos na terapêutica de candidíase oral em aids, em ensaios clínicos conduzidos com fluconazol e itraconazol, foi a base de sustentação para o CLSI sugerir “breakpoints” ou “valores de corte” para a interpretação do perfil de susceptibilidade de leveduras a estas drogas. Vários autores avaliaram a correlação clínico-laboratorial em pacientes com aids e candidíase orofaríngea, mostrando que os dados de CIMs gerados pela metodologia padronizada pelo CLSI são preditivos da evolução terapêutica com a droga testada (Cameron et al., 1993; Redding et al., 1994; He et al., 1994; Barchiesi et al., 1995; Ghannoum et al., 1996; Rex et al., 1997; Revankar et al., 1998; Rex, Pfaller 2002).

A utilização destes valores de corte é de grande utilidade na monitorização de mudanças no padrão de susceptibilidade a antifúngicos de amostras coletadas ao longo do tempo. Entretanto, a utilização destes resultados na definição da terapêutica individual de pacientes com micoses invasivas ainda deve ser feito com cautela, considerando não só os resultados laboratoriais, mas, também outros fatores prognósticos relevantes em cada caso (Rex, Pfaller, 2002).

Paralelamente aos esforços do CLSI para o aprimoramento de testes de susceptibilidade, a comunidade científica europeia se organizou na realização de estudos para otimização destes ensaios. Logo, a entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico na Europa, o EUCAST, designou um subcomitê para elaborar uma proposta alternativa em relação a padronização do teste de microdiluição em caldo para leveduras fermentadoras, baseada no documento CLSI M27-A (1997). Esta metodologia

incorporou algumas modificações no teste padrão do CLSI, sendo as principais a utilização do meio RPMI suplementado com 2% de glicose, para suportar melhor crescimento de leveduras fermentadoras, o aumento no tamanho do inóculo para $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL, possibilitando menor tempo de incubação do ensaio de 48h para 24h e, finalmente, a leitura dos testes por espectrofotometria, para eliminar a subjetividade da leitura visual do ensaio (Cuenca-Estrella et al., 2002; Chryssanthou et al., 2002).

Cuenca-Estrella et al., (2003) realizaram estudo multicêntrico avaliando a reprodutibilidade de dois métodos de microdiluição em caldo: EUCAST e CLSI M27-A2 (2002). Participaram deste trabalho nove laboratórios, sendo testados 60 isolados clínicos de *Candida* spp. frente a três drogas antifúngicas (fluconazol, itraconazol e 5-FC). A correlação entre as leituras de 24h para ambos os métodos foi de 99,2% e após 48h foi de 96,4%. A leitura de 24h do EUCAST possibilitou concordância maior que 95% para a grande maioria das drogas e para as espécies de leveduras testadas. Apenas ensaios realizados com isolados de *C. glabrata* apresentaram menor concordância e reprodutibilidade. Estes dados confirmam que a leitura de 24h do EUCAST oferece melhores resultados, devendo-se realizar leitura de 48h apenas para amostras com limitado crescimento após curto período de incubação.

Espinel-Ingroff et al., (2005) compararam as CIMs de fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol obtidas segundo duas metodologias: EUCAST e CLSI M27-A2 (2002). Foram selecionados 421 isolados de *Candida* spp. de seis diferentes centros. A concordância entre as duas metodologias para leitura de 24h em ambos os métodos foi boa em todas as drogas avaliadas: fluconazol (95%), voriconazol (94%), posaconazol (91%) e itraconazol (90%). A leitura de 48h não aumentou a concordância entre os métodos avaliados. Entretanto, os autores verificaram que os resultados das CIMs do EUCAST em relação a azólicos foram consistentemente menores que os dados obtidos com o método padrão do CLSI. Sendo assim, é possível que

os pontos de corte para a susceptibilidade a azólicos sugeridos pelo CLSI M27-A2 não sejam aplicáveis à metodologia do EUCAST.

Uma das principais diferenças entre as metodologias sugeridas pelo CLSI e pelo EUCAST é o critério de leitura utilizado. No CLSI é recomendada uma leitura visual após 24 e 48 horas de incubação, já no EUCAST a leitura é realizada através de espectrofotometria após 24 horas de incubação (Arthington-Skaggs, 2002).

A leitura espectrofotométrica é considerada menos subjetiva e mais prática que a leitura visual. Entretanto, os dados revisados de análise comparativa entre as metodologias adotadas pelo NCCLS e pelo EUCAST, mostram equivalência de resultados (Pfaller, Messe, Coffmann, 1995; Arthington-Skaggs et al., 2002).

Apesar da leitura espectrofotométrica não ser recomendada pelo CLSI no documento M27-A2, decidimos inseri-la em nosso protocolo para realizar uma comparação de resultados obtidos entre as leituras visuais e espectrofotométricas.

Em nosso estudo houve uma concordância de 96,87% entre os resultados apresentados nos dois critérios de leituras realizados após 24 horas de incubação. E em relação às leituras realizadas após 48 horas de incubação, a concordância entre os resultados foi de 98,21%.

Outros autores também correlacionaram os valores apresentados em leituras visuais e espectrofotométricas e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo.

Em um estudo realizado na Universidade de Iowa, Pfaller et al., (1995) compararam três diferentes critérios de leitura de valores de CIMs pelo método de microdiluição em caldo (documento M27-A): visual, visual com agitação e espectrofotométrica de 100 isolados clínicos de *Candida* spp. Houve uma variação de concordância de resultados entre 97% e 99% nos três critérios de leituras utilizados.

Espinel-Ingroff et al., (2005) conduziram um estudo multicêntrico que comparava a performance de leituras visuais e espectrofotométricas dos valores de CIMs apresentados após 24 e 48 horas de incubação frente a 71 isolados de *Candida* spp. testados contra quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) pelo método de microdiluição em caldo (documento M27-A2). Houve uma concordância de 93 a 100% entre os resultados apresentados intralaboratorialmente.

Tais informações sugerem que em instituições que contam com profissionais experientes na condução de ensaios de susceptibilidade a antifúngicos, a leitura espectrofotométrica acrescenta pouco na definição dos pontos de leitura em relação ao parâmetro visual. As dificuldades relacionadas ao estabelecimento da leitura da concentração inibitória mínima tanto para o critério visual quanto para o espectrofotométrico, particularmente entre os isolados que apresentam o crescimento do “trailing”, ainda permanecem.

Estes dados foram confirmados por estudo conduzido por Arthington-Skaggs et al., (2002) conduziram um estudo que avaliava o perfil de susceptibilidade de isolados de *Candida* spp. frente a fluconazol e itraconazol, sendo reavaliados os resultados por leitura visual e espectrofotométrica. Os resultados mostraram uma concordância de 98,99% (p < 0,0002) para o critério de leitura visual e 93,34% para o critério de leitura espectrofotométrica.

No presente estudo, foi possível verificar a presença de "trailing" em um total de 118 (52,67%) isolados, o que indica que apesar da alta concordância apresentada nos dois critérios de leitura, ainda assim permanece dúvida na interpretação final do ponto de leitura.

Importante observar que entre as 224 cepas testadas, 6 (2,67%) apresentaram valor de CIM de 16,0µg/mL após 24hrs de incubação, sendo que destas 4 (66,66%) apresentaram este perfil na leitura visual e 6 (100%) na leitura espectrofotométrica. Ao avaliarmos a leitura de 48hrs de incubação, 20 (8,92%) cepas apresentaram CIM ≥16,0µg/mL, sendo que destas 14 (70%) apresentaram esse perfil na leitura visual e 19 (95%) na leitura espectrofotométrica.

Estes resultados demonstram que os dados obtidos na leitura espectrofotométrica apresentaram um aumento ao invés de redução no número de cepas identificadas como SDD/R. Esta tendência observada nas leituras de cepas com valores de CIM elevadas não é aquela observada na grande maioria das cepas testadas, conforme o ilustrado na TABELA 2. Uma possibilidade para explicar esse fenômeno pode ser que, com estas cepas, a leitura visual tenha sido realizada numa perspectiva mais conservadora, considerando como "trailing" mesmo cepas onde a inibição de crescimento nas concentrações maiores tenha sido inferior a 50%. Neste cenário, a avaliação visual, mesmo que subjetiva, acaba permitindo a correção da leitura, otimizando o reconhecimento do fenômeno "trailing", e reduzindo a definição de cepas com falso perfil de resistência.

Em nossa investigação, das 224 cepas de *Candida tropicalis* testadas frente ao antifúngico fluconazol pelo método de microdiluição em caldo, 20 (8,92%) apresentaram valores de CIMs ≥16,0µg/mL nas leituras realizadas após 24 horas ou 48 horas de incubação em pelo menos um dos critérios de leitura utilizados (visual ou espectrofotométrico).

As 20 cepas com CIMs $\geq 16,0\mu\text{g/mL}$ foram selecionadas para análise de quantificação de ergosterol de células fúngicas (SQM).

De acordo com a nossa hipótese de trabalho, diferentemente dos resultados obtidos pela metodologia de microdiluição em caldo, dos 20 isolados testados, 17 (85%) foram considerados sensíveis (CIMs $< 4\mu\text{g/mL}$) e apenas 3 (15%) isolados foram considerados resistentes (CIMs $> 64\mu\text{g/mL}$) através da técnica de quantificação de ergosterol.

Assim, o fenômeno de “trailing” e as dificuldades decorrentes em sua interpretação podem justificar uma grande variabilidade nos índices de resistência de *C. tropicalis* aos azólicos que tem sido reportados na literatura. Desta forma, talvez seja necessário uma reavaliação na padronização do teste de susceptibilidade pela metodologia do CLSI para minorar a possibilidade de resultados de falsos índices de resistência em testes avaliando *Candida tropicalis*.

6. CONCLUSÕES

1. As leituras visuais e espectrofotométricas de ensaios com fluconazol de cepas de *C. tropicalis* apresentaram concordância de 96,87% e 98,21% após 24 e 48hrs de incubação, respectivamente;
 2. Nas leituras realizadas após 24hrs de incubação, os valores de CIM₅₀ foram de 0,5µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 1,0 µg/mL para a leitura visual. Já os valores de CIM₉₀ foram de 4,0µg/mL para a leitura espectrofotométrica e 8,0 µg/mL para leitura visual;
 3. Com relação às leituras realizadas após 48hrs de incubação, os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 2,0µg/mL e 8,0µg/mL, respectivamente, em ambos os critérios de leitura;
 4. O fenômeno de “trailing” moderado/intenso foi muito freqüente com cepas de *C. tropicalis*, dificultando a interpretação dos resultados.
 5. Utilizando-se o método de microdiluição em caldo das 224 cepas testadas, 20 (8,92%) foram classificadas como SDD/R a fluconazol, pois apresentaram valores CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ nas leituras visuais ou espectrofotométricas após 48 horas de incubação. A freqüência de isolados de *C. tropicalis* com o fenótipo "low-high MIC" observado entre estas 20 cepas foi 10 (50%) e 13 (65%) isolados na leitura visual e espectrofotométrica, respectivamente.
 6. Entre os 20 isolados inicialmente identificados como exibindo CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ nos ensaios de microdiluição em caldo, apenas 3 apresentaram composição em suas membranas compatíveis com fenótipo de resistência a fluconazol.
-

7. ANEXOS

Anexo 1: Critérios de susceptibilidade a fluconazol segundo documento M27-A2 (2002) do CLSI.

Susceptibilidade	Antifúngico – CIMs (µg/mL)
	Fluconazol
Sensível	≤ 8,0
SDD*	16 - 32,0
Resistente	≥ 64,0

*SDD – susceptibilidade dependente da dose. Indica a necessidade de elevada dose terapêutica para resposta clínica satisfatória (CLSI, 2002).

Anexo 2: Tabela de CIM (concentrações inibitórias mínimas) dos 224 isolados frente a fluconazol nos dois critérios de leitura avaliados.

	Nº Cepa	Leitura Visual		Leitura Espectrofotométrica	
		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1	574	1,0	2,0	1,0	2,0
2	1261B	0,5	2,0	0,5	2,0
3	1257	0,25	1,0	0,25	1,0
4	804	0,5	1,0	0,5	2,0
5	798A	4,0	4,0	2,0	4,0
6	1107	1,0	2,0	0,5	2,0
7	1106	0,5	2,0	0,5	2,0
8	1401	1,0	2,0	0,5	1,0
9	1404	1,0	2,0	0,5	1,0
10	1061	0,5	2,0	0,5	4,0
11	1052A	0,25	1,0	0,25	0,5
12	960	2,0	4,0	2,0	4,0
13	957	4,0	4,0	4,0	8,0
14	1087	0,25	2,0	0,25	64,0
15	1083A	2,0	4,0	2,0	2,0
16	1217A	0,5	2,0	0,5	2,0
17	1215B	1,0	2,0	1,0	2,0
18	1108A	1,0	2,0	1,0	2,0
19	1142	0,5	1,0	0,5	1,0
20	1040	2,0	2,0	2,0	2,0
21	1041	1,0	1,0	0,5	2,0
22	953	1,0	1,0	0,5	1,0
23	951	0,5	1,0	0,5	2,0
24	743	0,5	1,0	0,25	1,0
25	727A	0,5	2,0	0,25	1,0
26	948	0,5	4,0	0,5	8,0
27	943	0,5	1,0	0,5	1,0
28	1148	0,5	1,0	0,5	1,0
29	1151	0,5	1,0	0,5	1,0
30	1064	1,0	2,0	0,5	1,0
31	1067A	0,5	2,0	0,5	4,0
32	873	0,5	1,0	0,5	1,0
33	874A	0,5	1,0	0,5	1,0
34	769	0,5	1,0	0,25	1,0
35	764	0,25	1,0	0,25	0,5
36	1418	0,5	1,0	0,25	1,0
37	1405	8,0	64,0	2,0	64,0

38	1247	0,5	1,0	0,5	1,0
39	1246	0,25	0,5	0,25	0,5
40	1104	0,5	1,0	0,5	1,0
41	1091A	0,25	1,0	0,25	1,0
42	934	0,25	1,0	0,25	0,5
43	919	0,5	1,0	0,5	1,0
44	889	1,0	2,0	1,0	2,0
45	884	0,5	2,0	0,5	2,0
46	575A	0,5	1,0	0,5	1,0
47	569A	1,0	1,0	0,5	1,0
48	1029	0,5	1,0	0,5	0,5
49	1026	0,5	2,0	0,25	1,0
50	1016	1,0	2,0	0,5	1,0
51	1017	1,0	2,0	0,5	1,0
52	1595A	0,5	0,5	0,25	0,5
53	1596	1,0	2,0	0,25	1,0
54	1157	1,0	2,0	1,0	2,0
55	1169	0,5	2,0	1,0	1,0
56	1375	0,5	1,0	0,5	1,0
57	1365	0,5	1,0	0,25	1,0
58	1286	0,5	1,0	0,5	0,5
59	1293	1,0	1,0	0,25	1,0
60	678A	0,5	1,0	0,5	0,5
61	672	1,0	2	0,5	2,0
62	980	1,0	1,0	0,5	2,0
63	979	1,0	1,0	0,5	2,0
64	961	0,5	1,0	0,5	1,0
65	967	0,5	1,0	0,25	1,0
66	899	2,0	4,0	2,0	4,0
67	910	0,25	0,5	0,25	0,5
68	816	0,5	1,0	0,5	1,0
69	823	0,5	1,0	0,25	0,5
70	978	1,0	2,0	0,5	2,0
71	976	0,5	1,0	0,5	1,0
72	1362	8,0	8,0	4,0	8,0
73	1357	0,25	1,0	0,25	2,0
74	896A	0,5	1,0	0,5	1,0
75	891	0,25	2,0	0,25	2,0
76	773	0,5	1,0	0,5	1,0
77	778A	0,5	2,0	0,5	1,0
78	815	0,5	1,0	0,5	2,0
79	805	0,5	1,0	0,25	1,0

80	779B	2,0	4,0	2,0	4,0
81	797A	0,5	2,0	0,5	1,0
82	1218	1,0	2,0	0,5	2,0
83	1221	2,0	4,0	1,0	2,0
84	564	0,5	0,5	0,5	0,5
85	563	2,0	2,0	1,0	2,0
86	1222	0,5	1,0	0,5	1,0
87	1223	2,0	2,0	1,0	2,0
88	1556	1,0	2,0	1,0	2,0
89	1582	0,5	1,0	0,5	1,0
90	974	0,5	2,0	0,5	2,0
91	975	0,25	1,0	0,125	1,0
92	1398	0,5	1,0	0,5	1,0
93	1396	0,5	1,0	0,5	1,0
94	1176	0,5	2,0	0,5	1,0
95	763A	0,5	1,0	0,5	1,0
96	762	1,0	1,0	0,5	1,0
97	1346	2,0	4,0	1,0	2,0
98	1342	0,25	0,25	0,25	1,0
99	519	0,5	1,0	0,5	1,0
100	517	1,0	2,0	1,0	2,0
101	1554	0,5	1,0	0,25	0,5
102	1537	0,5	1,0	0,25	0,5

122	595A	0,25	2,0	0,25	1,0
123	870	8,0	8,0	8,0	16,0
124	872	8,0	32,0	16,0	32,0
125	698	0,5	1,0	0,25	0,5
126	844	0,5	1,0	0,25	0,5
127	716	0,5	1,0	0,5	1,0
128	707	1,0	2,0	1,0	1,0
129	651	0,5	0,5	0,25	0,5
130	715	0,25	1,0	0,25	1,0
131	527	0,5	1,0	0,5	1,0
132	621	1,0	2,0	1,0	2,0
133	537	0,5	1,0	0,5	0,5
134	545	0,5	2,0	0,5	1,0
135	626	1,0	2,0	1,0	1,0
136	720	0,5	1,0	0,25	1,0
137	723	0,5	1,0	0,5	1,0
138	725	0,5	1,0	0,25	1,0
139	642	0,5	1,0	0,25	1,0
140	638A	0,5	1,0	0,5	1,0
141	687	0,5	1,0	0,5	1,0
142	570	1,0	2,0	1,0	2,0
143	1599	1,0	1,0	0,5	1,0
144	1081	1,0	1,0	1,0	1,0
145	1079	0,5	1,0	0,5	1,0
146	1003	0,25	1,0	0,25	1,0
147	1001	8,0	8,0	4,0	4,0
148	546A	0,25	0,5	0,25	0,5
149	551	1,0	2,0	0,5	1,0
150	749A	0,5	1,0	0,5	1,0
151	1505	1,0	1,0	0,25	1,0
152	1534	0,5	1,0	0,5	1,0
153	1588	1,0	2,0	0,25	2,0
154	1587	0,25	4,0	0,25	4,0
155	554	0,5	1,0	0,5	2,0
156	555	0,5	2,0	0,5	8,0
157	670	0,5	64,0	2,0	64,0
158	665	1,0	2,0	0,25	2,0
159	501	4,0	4,0	0,125	1,0
160	318	0,5	0,5	0,125	0,25
161	322	0,125	8,0	0,125	0,25
162	395	0,125	8,0	0,125	2,0
163	446	2,0	4,0	1,0	1,0

164	466	4,0	8,0	2,0	8,0
165	459	2,0	8,0	1,0	4,0
166	453A	0,5	0,5	0,5	0,5
167	260A	4,0	4,0	0,5	4,0
168	243	0,125	2,0	0,25	4,0
169	238	4,0	4,0	0,5	8,0
170	8	4,0	4,0	0,5	2,0
171	9	4,0	8,0	2,0	4,0
172	98	0,125	0,125	2,0	4,0
173	103	4,0	4,0	2,0	4,0
174	51	0,125	8,0	0,125	8,0
175	57	4,0	4,0	4,0	4,0
176	86	0,125	0,5	0,125	0,125
177	275	8,0	8,0	0,125	4,0
178	131	0,125	0,125	0,125	0,125
179	136	4,0	4,0	2,0	4,0
180	157	2,0	2,0	0,25	0,5
181	180	0,125	0,125	0,125	0,125
182	506A	4,0	4,0	4,0	8,0
183	471	4,0	4,0	4,0	8,0
184	472	4,0	4,0	4,0	8,0
185	483	8,0	8,0	8,0	16,0
186	494	4,0	4,0	2,0	4,0
187	495A	2,0	2,0	4,0	4,0

206	279	4,0	8,0	8,0	4,0
207	300	8,0	16,0	8,0	8,0
208	305	8,0	8,0	4,0	8,0
209	2	8,0	8,0	8,0	8,0
210	12	4,0	8,0	2,0	2,0
211	90	8,0	8,0	4,0	8,0
212	89	8,0	16,0	2,0	16,0
213	19	4,0	8,0	8,0	8,0
214	23	8,0	8,0	4,0	8,0
215	24	4,0	8,0	4,0	2,0
216	114	4,0	4,0	8,0	8,0
				16,0	16,0

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A. Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005; 43(4): 1829-1835.

Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(5): 239-41.

Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2005; 9(5): 411-8.

Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1999; 37(10): 3332-7.

Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(8): 2081-5.

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW; Candidemia Active Surveillance Group. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(8): 2477-81.

Barchiesi F, Hollis RJ, McGough DA, Scalise G, Rinaldi MG, Pfaller MA. DNA subtypes and fluconazole susceptibilities of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1995; 20(3):634-640.

Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Di Francesco LF, Caselli F, Giannini D, Giacometti A, Gavaudan S, Scalise G. Experimental Induction of fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC750. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(6): 1578-1584.

Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BMC Infect Dis. 2006 10; 6:21.

Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *albicans* ID and CHROMagar *Candida* plates. J Clin Microbiol. 1996; 34(2): 454-6.

Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago AR, Pabón ML, Tabares A, Arango M, Restrepo A, Newel V. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de Difusión de disco. Evaluation of *Candida* species susceptibility to fluconazole with the disk diffusion method. Biomédica. 2003; 23:31-37.

Bernhardt H, Knoke M. Mycological Aspects of Gastrointestinal microflora. Scand J Gastroenterol. 1997; 32 (S222): 102 -106.

Bulmer GS, Marquez ML, Co-Barcelona L, Fromtling RA. Yeasts and fluconazole susceptibility in Philippines. Mycopathologia. 1999; 146(3): 117-20.

Cameron ML, Schell WA, Bruch S, Bartlett JA, Waskin HA, Perfect JR. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(11):2449-2453

Casalinuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004; 8(2):69-77.

Chen YC, Chang SC, Sun CC, Yang LS, Hsieh WC, Luh KT. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997; 18(5): 369-75.

Cheng MF, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48(1):33-37

Chryssanthou E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre Yeast-One Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(11):4181-4183.

Colombo AL, Nucci M, Salomão, R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, Wey S. High rate of non-*albicans* candidemia in brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34(4): 281-286.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(5): 599-607.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*. 2003; 41(3): 235-9.

Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003b; 22(8): 470-474.

Costa SF, Marinho I, Araújo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2 – year prospective study. J Hosp Infect. 2000; 45(1): 69-72.

Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. J Antimicrob Chemother. 2002; 49(6):981-987.

Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodriguez-Tudela JL. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect. 2003; 9(6):467-74.

DeMuri GP, Hostetter MK. Evidence for beta 1 integrin fibronectin receptor in *Candida tropicalis*. J Infect Dis. 1996; 174(1): 127-132.

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, and Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1298-1302.

DiNubile MJ, Hille D, Sable CA, Kartsonis NA. Invasive candidiasis in cancer patients: observations of randomized clinical trial. J Infect. 2005; 50(5): 443-9.

Duran MT, Velasco D, Canle D, Moure R, Villanueva R. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21(9):488-92.

Edwards JE, Montgomerie JZ, Ishida K, Morrison JO, Guze LB. Experimental hematogenous endophthalmitis due to *Candida*: species variation in ocular pathogenicity. J Infect Dis. 1977; 135(2): 294-297.

Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol. 1992; 30(12):3138-3145.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Forthergill A, Pfaller MA, Rianldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for *Candida* spp.: a Collaborative Study. J Clin Microbiol. 2005, 43(9):4535-4540.

Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, Lebeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. J Clin Microbiol. 1996; 34(7): 1846-1848.

Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, Body BA, Frey C, Hall G, Roberts GD Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(1):39-45.

Ghannoum MA. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding fluconazole therapy? Clin Infect Dis. 1996; 22-2:S161-S165.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(3):401-415.

Goldani LZ, Mario PSS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J Infect. 2003; 46(3): 155-160.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis. 2003; 37(9):1172-1177.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Hule S, Yeo SF, Brandt ME, and Warnock D. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol. 2004; 42(4): 1519-1527.

Hasenclever H, Mitchell W. Pathogenicity of *C. albicans* and *C. tropicalis*. Sabouraudia. 1961; 1(1): 16-21.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4): 462-78.

He X, Tiballi RN, Zarins LT, Bradley SF, Sangeorzan JA, Kauffman CA. Azole resistance in oropharyngeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(10):2495-2497

Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diag Microbiol Infect Dis. 2004; 48(3):153-160

Hurley R, Winner H. The pathogenicity of *C. tropicalis*. J Pathol Bacteriol. 1962; 84(7): 33-38.

Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, Baughman WS, Reingold AL, Rothrock GA, Pfaller MA, Pinner RW, Hajjeh RA. The epidemiology of candidemia in two United States Cities: results of a population-based active surveillance. Clin Infect Dis. 1999; 29(5): 1164-1170.

Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. J Hosp Infect. 2003; 54(1): 18-24.

Kucukates E, Erturan Z, Susever S, Yegenoglu Y. In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. APMIS. 2005; 113(4):278-83.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. Editora Sarvier. São Paulo. 2002.

Larone DH. Yeasts and yeastlike organisms. In: Larone DH, editor. Medically important fungi a guide to identification. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1995. p. 61-89.

Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis. 2003; 15(36)1:S31-S41.

Louria DB, Buse M, Brayton RG, Finkel G. The pathogenesis of *C. tropicalis* infections in mice. Sabouraudia. 1996; 5(1): 14-25.

MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. Clin Infect Dis. 1998; 26(3): 642-645.

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, and Pipet D, for the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991-2000. Clin Infect Dis. 2004; 38(3): 311-320.

Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(6):1383-6.

Martin D, Persat F, Piens MA, Picot S. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24(5): 329-33.

Mathews MS, Samuel PR, Suresh M. Emergence of *Candida tropicalis* as the major cause fungaemia in India. Mycoses 2001; 44(7-8): 278-280.

Mattiuzzi G, Giles FJ. Management of intracranial fungal infections in patients with haematological malignancies. Br J Haematol. 2005; 131(3): 287-300.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P, 1992, Vilanova, Pa.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard M27-T, 1995, Wayne, Pa.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A, 1997, Wayne, Pa.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2a ed., 2002, Vilanova, Pa.

Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Martínez-González J, León-Regidor MA, Ibáñez-Lucía P, Torres-Rodríguez and Study Group of Fungal Infection in the UTI. Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Intensive Care Med. 1997; 23(1): 23-30.

Nucci M, Colombo AL, Silveira F, Richtmann R, Salomão R, Branchini ML, Spector N. Risk factors for death in patients with candidemia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998; 19(11):846-50.

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamil RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, and Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2.000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(10): 3149-3154.

Pagano L, Antinori A, Ammassari A, Mele L, Nosari A, Melillo L, Martino B, Sanguinetti M, Equitani F, Nobile F, Carotenuto M, Morra E, Morace G, Leone G. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. *Eur J Haematol*. 1999; 63(2): 77-85.

Pappas PG, Rex JE, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly WG, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE and Dismukes WE, for the NIAID Mycoses study group. A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(5): 634-643.

Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatric and adults with nosocomial candidaemia. *Mycopathologia*. 2005; 160(2): 111-6.

Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. Pfaller MA, Multicen 0 0 12 491.395

Pfaller MA, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing. Current state of technology, limitations, and standardization. Infect Dis Clin North Am. 1993; 7(2):435-444.

Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG, Cooper CR, McGinnis MR. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. J Clin Microbiol. 1995; 33(5):1104-1107.

Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. J Clin Microbiol. 1995; 33(5):1094-7.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of Nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. Diagnostic Microbiology Infectious Diseases 1998a; 30: 121-129.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA, The Sentry Participant Group. International surveillance of bloodstream infection due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for The SENTRY Program. J Clin Microbiol. 1998b; 36(7):1886-1889.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader H, Messer S, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. International surveillance of blood stream infectious due to *Candida* species in European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandian agents. SENTRY Participant Group (Europe). Diag Microbiol Infect Dis. 1999; 35(1): 19-25.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader H, Messer S, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3):747-51.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA; SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol. 2001; 39(9): 3254-3259.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer AS, Hollis RJ and the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. J Clin Microbiol. 2002; 40(3): 852-856.

Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. J Clin Microbiol. 2002; 40(10):3551-3557.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Diekema DJ. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6.970 clinical isolates of *Candida* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6): 1723-1727.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN. In vitro susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. Diagn Microbiol and Infect Dis. 2004; 48(2):101-105.

Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal

Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol. 2005; 43(12): 5848-59.

Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine-Chalberg J, Pfaller M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. Clinical Infectious Diseases 1994; 18(2):240-242

Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. J Clin Microbiol. 1998;36(1): 153-6.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(4):367-381.

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bortlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo. C Infect Dis 1997; 24(2):235-247

Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro a therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(1): 129-134.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4):643-658.

Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis. 2002; 15-35(8):982-989

Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Cordoba S, Canteros CE, Saporiti A; EMIFN. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2005; 37(4): 189-95.

Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002;2(2):73-85.

Silva V, Diaz MC, Febre N; Chilean Invasive Fungal Infections Group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. Med Mycol. 2004; 42(4): 333-9.

Specchia G, Pastore D, Montagna MT, Carluccio P, Ciuffreda L, Rizzi R, Liso A. Fungemia in acute leukemia patients: a single institution's experience. New Microbiol. 2004; 27(4): 407-10.

Stamos JK, Rowley AH. Candidemia in a pediatric population. Clin Infect Dis. 1995; 20(3): 571-5.

St – Germain G. Impact of endpoint definition on the outcome of antifungal susceptibility test with *Candida* species: 24 – versus 48h incubation ant 50 versus 80% reduction in growth. Mycoses. 2001; 44(1-2): 37-45.

Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Iinuma Y, Ichiyama S. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2): 283-9.

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month

European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23(4): 317-322.

Walsh T, Merz W. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *C. tropicalis*. *Am J Clin Pathol*. 1986; 85(4): 498-502.

Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia – The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*. 1988; 148(12): 2642-2645.

Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Pathogenicity of *C. tropicalis* and *C. albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infection and Immunity*. 1980; 29(2): 808-813.

Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infection and Immunity*. 1982; 37(2): 833-836.

Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995; 20(1):115-125.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Talent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(7): 309-317.

Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercan B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Kremery V, De Pauw B, Meunier F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for Research and treatment of cancer (EORTC). *Clin Infect Dis*. 1999; 28(5): 1071-1079.

Voss A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Vandenbroucke-Grauls CM, Verbrugh HA, Vos MC, Weersink AY, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF.

Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch University Hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15(12): 909-912.

Zaoutis TE, Greves HM, Lautenbach E, Bilker WB, Coffin SE. Risk factors for disseminated candidiasis in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(7): 635-641.

Abstract

Introduction: Recently, *C. tropicalis* resistance to fluconazole has been highlighted as a problem around the world. A large variation on resistance rates was mentioned in previous reports and it may be in part related to the phenomenon "trailing". The term 'trailing' has been used to describe the reduced but persistent growth that some isolates of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* exhibit in susceptibility testing with azole antifungal agents, such as fluconazole. Arthington-Skaggs et al., (1999), suggested the technique of quantification of ergosterol content to determine values of MIC in strains with "trailing" growth. **Objectives:** The aims of this study were: 1. to evaluate the antifungal susceptibility profile of *C. tropicalis* bloodstream isolates to fluconazole, 2. to evaluate the prevalence of isolates with the low-high phenotype and 3. to use the quantification of ergosterol content as tool to identify strains truly resistant to fluconazole. **Materials and Methods:** We obtained a collection of 224 samples of bloodstream *C. tropicalis* strains isolated between 2000 to 2005. After initial screening for *Candida albicans* in chromogenic medium CHROMagar® *Candida*, the samples of non-*albicans* *Candida* species were identified based on their micromorphology and biochemical profile evaluated by the commercial system ID32C. The susceptibility testing of clinical isolates was performed by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) broth microdilution method. The methodology standard used to quantify the ergosterol content was performed in accordance with Arthington-Skaggs et al., 1999. **Results:** MIC₅₀ values at 24 hours of incubation was 0,5µg/mL by spectrophotometric reading and 1,0 µg/mL by visual reading. MIC₉₀ values at 24 hours of incubation was 4,0µg/mL by spectrophotometric reading and 8,0 µg/mL by visual reading. After 48 hours of incubation, the MIC₅₀ and MIC₉₀ were 2,0µg/mL and 8,0µg/mL for both readings. The rates of agreement between the visual and spectrophotometric readings were 96,87% and 98,21% after 24 and 48 hours of incubation, respectively. The 20 (8.92%) strains that at 24 hours of incubation exhibited MIC values ≥16µg/mL in any reading were submitted to the quantification of ergosterol content. Seventeen (85%) of these 20 isolates tested were considered susceptible to fluconazole (MICs ≤4µg/ml) and only 3 (15%) isolates were considered truly resistant (MICs ≥64µg/ml). **Conclusions:** 1. Visual and spectrophotometric readings of fluconazole susceptibility testing presents similarity of results; 2. The phenomenon of moderate/intense "trailing" is very frequent with strains of *C. tropicalis*, making it difficult to interpret the results; 3. The great majority (85%) of the 20 samples initially identified as resistant in the microdilution method showed reduction of ergosterol content when exposed to the drug, having shown to be susceptible; 4. This data suggest that the occurrence of *Candida tropicalis* truly resistant to fluconazole is less frequent than suggested in the literature.